

CÉLULAS MODIFICADAS POR RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCERES QUE EXPRESAN CLDN6

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La inmunoterapia a base de transferencia de células adoptivas (ACT) puede definirse ampliamente como una forma de inmunización pasiva con células T previamente sensibilizadas que se transfieren a receptores no inmunes o al anfitrión autólogo después de la expansión ex vivo desde frecuencias bajas de precursores hasta números de células clínicamente relevantes. El uso de enfoques de ingeniería genética para insertar receptores dirigidos a antígenos de especificidad definida en las células T ha ampliado enormemente las capacidades potenciales de ACT. Los receptores de antígenos quiméricos (CARs) son un tipo de receptor dirigido a antígenos compuesto de dominios de señalización de células T intracelulares fusionados con dominios de unión de antígenos extracelulares, más comúnmente fragmentos variables de cadena única (scFv) de anticuerpos monoclonales. Los CARs reconocen directamente los antígenos de la superficie celular, independientemente de la presentación mediada por MHC.

Los intentos de tratar el cáncer mediante el uso de células T modificadas genéticamente para atacar antígenos expresados en células tumorales a través de la expresión de CARs han tenido un éxito muy limitado. A pesar de las respuestas significativas en pacientes con neoplasias malignas de células B, las respuestas clínicas exitosas después de la selección de tumores sólidos usando células T con CAR con diversas especificidades son mucho más limitadas.

La terapia con células T con CAR para tumores sólidos se enfrenta a numerosos desafíos. Estos incluyen barreras físicas, el microambiente tumoral inmunosupresor y, lo que es más importante, la falta de objetivos tumorales verdaderamente específicos y seguros.

25 Por lo tanto, existe una necesidad urgente en la técnica de composiciones y métodos eficaces para el tratamiento del cáncer usando CARs. La presente invención aborda esta necesidad.

Para implementar una terapia a base de CAR para el tratamiento de cánceres sólidos, seleccionamos el antígeno oncofetal CLDN6 (Claudin 6) que tiene todas las características de un objetivo ideal para la terapia a base de CAR. CLDN6 es una proteína de membrana tetraespín que participa en la formación de uniones estrechas primitivas durante la organogénesis y, por lo tanto, se expresa exclusivamente en niveles significativos durante el desarrollo fetal y está ausente en tejidos adultos sanos, pero altamente sobreexpresada en diferentes cánceres de alta necesidad médica, incluidos los de ovario, cánceres de endometrio, testículo y pulmón.

CLDN6 tiene bucles extracelulares que se pueden administrar y los niveles de la

superficie celular son lo suficientemente altos como para permitir el reconocimiento de las células T con CAR. Además, la expresión de CLDN6 se correlaciona con la progresión de la enfermedad, ya que podría detectarse con mayor frecuencia en lesiones metastásicas y células desdiferenciadas, lo que sugiere un papel en los procesos oncogénicos. La seguridad de la selección de CLDN6 se sugiere en un ensayo clínico de fase I/II que usó el anticuerpo monoclonal anti-CLDN6 IMAB027 en pacientes con carcinoma de ovario avanzado (OVAR, NCT02054351), en donde no se detectaron eventos adversos relacionados con IMAB027.

Basándonos en los resultados de nuestros experimentos *in vitro* e *in vivo*, seleccionamos un CAR de segunda generación con un dominio 4-1BB (CLDN6-CAR-CD8h-BBz) como estructura principal para pruebas preclínicas y clínicas. Podríamos demostrar un reconocimiento altamente específico y sensible de células objetivo que expresan CLDN6, así como un alto potencial de supervivencia y estimulación repetitiva de células T con CAR.

Además, evaluamos el potencial antitumoral *in vivo* de CLDN6-CAR usando un modelo de xenoinjerto de carcinoma de ovario y pudimos demostrar que la transferencia adoptiva de células T transducidas con CLDN6-CAR dio como resultado la erradicación completa de tumores avanzados. Además, estos resultados podrían reproducirse con células T con CAR criopreservadas que se generaron en las instalaciones de GMP.

Como se pudo demostrar en el pasado, que el resultado clínico de la terapia con células T con CAR se correlaciona positivamente con la persistencia de células T con CAR infundidas en el cuerpo (Robbins et al. (2004) J Immunol. 173 (12): 7125-30, Huang et al. (2005) 28 (3): 258-67), combinamos la terapia CLDN6-CAR con nuestro innovador concepto de expansión CAR *in vivo* usando ARNm formulado en liposomas que codifica para el antígeno CAR (documento WO 2016/180778).

Finalmente, pudimos demostrar en diferentes modelos tumorales que la combinación de células T con CAR transferidas adoptivamente junto con la vacunación a base de ARN_(LIP) acelera las respuestas antitumorales en curso y también puede restaurar la eficacia antitumoral de dosis insuficientes de células T con CAR.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona una molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende:

- i) un dominio de unión al antígeno CLDN6;
- ii) un dominio transmembrana; y
- iii) un dominio intracelular que comprende un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización CD3-zeta.

En una modalidad, el dominio de unión al antígeno CLDN6 comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un scFv, un Fv, un Fab, un (Fab')₂, un anticuerpo de dominio único

(SDAB), un dominio VH o VL, o un dominio VHH de camélido. En una modalidad, el dominio de unión al antígeno CLDN6 comprende un scFv. En una modalidad, el dominio de unión al antígeno CLDN6 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 o una variante funcional de la misma.

- 5 En una modalidad, el dominio coestimulador 4-1BB comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 o una variante funcional de la misma. En una modalidad, la molécula de CAR de la invención no comprende un dominio coestimulador adicional.

En una modalidad, el dominio de señalización CD3-zeta comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 o una variante funcional de la misma.

- 10 En una modalidad, el dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFRR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1),
 15 CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gamma, IL7Ra, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAMI (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGLI, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME
 20 (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, y NKG2C, o una variante funcional del mismo.

En una modalidad, el dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana CD8 α . En una modalidad, el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 o una variante funcional de la misma.

- 25 En una modalidad, el dominio de unión a antígeno está conectado al dominio transmembrana mediante un dominio de bisagra. En una modalidad, el dominio de bisagra es un dominio de bisagra de CD8 α . En una modalidad, el dominio de bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 o una variante funcional de la misma.

En una modalidad, la molécula de CAR de la invención comprende:

- 30 i) un dominio de unión al antígeno CLDN6;
 ii) un dominio de bisagra de CD8 α ;
 iii) un dominio transmembrana de CD8 α ; y
 iv) un dominio intracelular que comprende un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización CD3-zeta.

- 35 En una modalidad, la molécula de CAR de la invención comprende además una secuencia líder.

En una modalidad, la molécula de CAR de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 o una variante funcional de la misma.

La presente invención proporciona además un ácido nucleico que codifica para la molécula de CAR de la invención. En una modalidad, el ácido nucleico es ADN o ARN.

5 La presente invención proporciona además un vector que comprende el ácido nucleico de la invención. En una modalidad, el vector se selecciona del grupo que consiste en un vector de ADN, un vector de ARN, un plásmido, un vector de lentivirus, un vector adenoviral y un vector de retrovirus. En una modalidad, el vector comprende además un promotor. En una modalidad, el promotor se elige de un promotor EF-1, un promotor del gen CMV IE, un promotor EF-1 α , un
10 promotor de ubiquitina C o un promotor de fosfoglicerato cinasa (PGK).

La presente invención proporciona además una célula efectora inmunitaria, que comprende:

la molécula de CAR de la invención;
el ácido nucleico de la invención; o
15 el vector de la invención.

En una modalidad, la célula efectora inmunitaria se modifica genéticamente para expresar el CAR. En una modalidad, la célula efectora inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en una célula T, una célula asesina natural (NK) y un linfocito T citotóxico (CTL). En una modalidad, la célula efectora inmunitaria es una célula T CD8+. En una modalidad, la célula
20 efectora inmunitaria es una célula humana.

La presente invención proporciona además una población de células efectoras inmunitarias que comprenden varias células efectoras inmunitarias de la invención.

En una modalidad de la célula efectora inmunitaria de la invención o la población de células efectoras inmunitarias de la invención, las células carecen de expresión o tienen una
25 expresión baja de un TCR funcional o un HLA funcional.

La presente invención proporciona además un método para fabricar una célula efectora inmunitaria o una población de células efectoras inmunitarias, que comprende introducir el ácido nucleico de la invención o el vector de la invención en una célula efectora inmunitaria, en condiciones tales que la molécula de CAR se exprese.

30 La presente invención proporciona además un método para estimular una respuesta inmunitaria mediada por células a una población o tejido de células objetivo que expresan CLDN6 en un sujeto, el método comprende proporcionar al sujeto una cantidad eficaz de una célula efectora inmunitaria de la invención o una población de células efectoras inmunitarias de la invención. La célula efectora inmunitaria o la población de células efectoras inmunitarias
35 pueden generarse *ex vivo* y administrarse al sujeto o la célula efectora inmunitaria o la población de células efectoras inmunitarias puede generarse en el sujeto.

La presente invención proporciona además un método para tratar a un sujeto que tenga una enfermedad asociada con la expresión de CLDN6, que comprende proporcionar al sujeto una cantidad eficaz de una célula efectora inmunitaria de la invención o una población de células efectoras inmunitarias de la invención. La célula efectora inmunitaria o la población de células efectoras inmunitarias pueden generarse *ex vivo* y administrarse al sujeto o la célula efectora inmunitaria o la población de células efectoras inmunitarias puede generarse en el sujeto. En una modalidad, la enfermedad asociada con la expresión de CLDN6 se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad proliferativa, una condición precancerosa, un cáncer y una indicación no relacionada con el cáncer asociada con la expresión de CLDN6. En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer de piel, melanomas, cáncer de cabeza y cuello, sarcomas, cáncer de vías biliares, cáncer de células renales, y cáncer de vejiga urinaria.

La presente invención proporciona además un método para proporcionar inmunidad antitumoral en un sujeto que comprende proporcionar al sujeto una cantidad eficaz de una célula efectora inmunitaria de la invención o una población de células efectoras inmunitarias de la invención. La célula efectora inmunitaria o la población de células efectoras inmunitarias pueden generarse *ex vivo* y administrarse al sujeto o la célula efectora inmunitaria o la población de células efectoras inmunitarias puede generarse en el sujeto. En una modalidad, el tumor es un tumor que expresa CLDN6.

En una modalidad de los métodos de la invención, la célula efectora inmunitaria o la población de células efectoras inmunitarias es autóloga o alogénica del sujeto.

En una modalidad de los métodos de la invención, el método comprende además administrar un agente que aumente la eficacia de la célula efectora inmunitaria o la población de células efectoras inmunitarias. En una modalidad, dicho agente se elige entre uno o más de:

- un inhibidor de la proteína fosfatasa;
- un inhibidor de cinasa;
- una citocina;
- un inhibidor de una molécula inhibidora inmunitaria; o
- un agente que disminuye el nivel o la actividad de una célula TREG.

En una modalidad de los métodos de la invención, el método comprende además la etapa de poner en contacto la célula efectora inmunitaria o la población de células efectoras inmunitarias, ya sea *ex vivo* o en el sujeto, con una molécula de antígeno afín que se una al dominio de unión al antígeno CLDN6. En una modalidad, la molécula de antígeno afín se selecciona del grupo que consiste en CLDN6 o un fragmento del mismo, o una variante de CLDN6 o un fragmento de CLDN6. En una modalidad, la célula efectora inmunitaria o la

población de células efectoras inmunitarias se pone en contacto con la molécula de antígeno afín en condiciones tales que se produce la expansión y/o activación de la célula efectora inmunitaria o la población de células efectoras inmunitarias. En una modalidad, el paso de poner en contacto la célula efectora inmunitaria o la población de células efectoras inmunitarias con la molécula de antígeno afín tiene lugar *in vivo* o *ex vivo*.

En una modalidad de los métodos de la invención, el método comprende la etapa de administrar al sujeto la molécula de antígeno afín o un ácido nucleico que codifique para la misma. En una modalidad, el ácido nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín se expresa en células del sujeto para proporcionar la molécula de antígeno afín. En una modalidad, la expresión de la molécula de antígeno afín se encuentra en la superficie celular. En una modalidad, el ácido nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín se expresa de forma transitoria en las células del sujeto. En una modalidad, el nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín es ARN. En una modalidad, la célula efectora inmunitaria o la población de células efectoras inmunitarias y/o la molécula de antígeno afín o el ácido nucleico que la codifica para se administran sistémicamente. En una modalidad, después de la administración sistémica del ácido nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín, se produce la expresión del ácido nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín en el bazo. En una modalidad, después de la administración sistémica del ácido nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín, se produce la expresión del ácido nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín en células presentadoras de antígenos, preferiblemente células presentadoras de antígenos profesionales. En una modalidad, las células presentadoras de antígenos se seleccionan del grupo que consiste en células dendríticas, macrófagos y células B. En una modalidad, después de la administración sistémica del ácido nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín, no se produce o esencialmente ninguna expresión del ácido nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín en el pulmón y/o el hígado. En una modalidad, después de la administración sistémica del ácido nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín, la expresión del ácido nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín en el bazo es al menos 5 veces la cantidad de expresión en el pulmón.

En una modalidad, el ácido nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín se formula en un vehículo de administración. En una modalidad, el vehículo de administración comprende partículas. En una modalidad, el vehículo de administración comprende al menos un lípido. En una modalidad, el por lo menos un lípido comprende al menos un lípido catiónico. En una modalidad, el lípido forma un complejo con y/o encapsula el ácido nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín. En una modalidad, el lípido está comprendido en una vesícula que encapsula el ácido nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín. En una modalidad, el ácido nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín se formula en

liposomas.

En una modalidad de la célula efectora inmunitaria de la invención, la población de células efectoras inmunitarias de la invención, o el método de la invención, la célula efectora inmunitaria o la población de células efectoras inmunitarias es una célula efectora inmunitaria que expresa CAR o una población de células efectoras inmunitarias que expresan CAR.

La presente invención proporciona además la molécula de CAR de la invención, el ácido nucleico de la invención, el vector de la invención, la célula efectora inmunitaria de la invención o la población de células efectoras inmunitarias de la invención para su uso como medicamento.

La presente invención proporciona además la molécula de CAR de la invención, el ácido nucleico de la invención, el vector de la invención, la célula efectora inmunitaria de la invención o la población de células efectoras inmunitarias de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad que exprese CLDN6.

La presente invención proporciona además un kit que comprende la molécula de CAR de la invención, el ácido nucleico de la invención, el vector de la invención, la célula efectora inmunitaria de la invención o la población de células efectoras inmunitarias de la invención. En una modalidad, el kit comprende además una molécula de antígeno afín que se une al dominio de unión al antígeno CLDN6 o un ácido nucleico que lo codifica. En una modalidad, el kit comprende además instrucciones para el uso del kit en los métodos de la invención.

En un aspecto adicional, la invención proporciona los agentes y composiciones tales como células efectoras inmunitarias descritas en el presente documento para su uso en los métodos descritos en el presente documento.

Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figuras 1A y 1B: Generación y caracterización de diferentes CLDN6-CARs.

Figura 1A - Se han diseñado y generado cuatro CARs diferentes de CLDN6 dirigidos a CLDN6 con base en los dominios variables de la cadena pesada (V_H) y ligera (V_L) del anticuerpo específico de CLDN6 IMAB206-C46S. IgG1 Δ Fc: dominio Fc bisagra-CH2-CH3 de IgG1 humana con sitios de unión al receptor Fc γ de IgG mutado (Fc γ R) para prevenir la activación por células inmunes innatas que expresan Fc γ R (Hombach A. et al., (2010) Gene Therapy 17, 1206-1213); CD28 Δ Lck: dominio transmembrana y citoplásmico de CD28 con una delección en la porción de unión de Lck del endodominio CD28 que anula la inducción de IL-2 luego de la activación de CAR para evitar la expansión de células Treg no deseada en el sitio del tumor (Kofler DM et al., (2011) Molecular Therapy 19 (4), 760–767); 4-1BB: endodominio coestimulador 4-1BB; CD3 ζ : dominio de señalización de CD3 ζ ; CD3 ζ^* : CD3 ζ con mutación Q14 → K; CD8 α : dominio de bisagra de CD8 α humano. Figura 1B - Prueba funcional de diferentes

CLDN6-CARs en un ensayo de esferoide tumoral PA1-SC12-A2-eGFP. La lisis de los esferoides tumorales se analizó en función de la expresión de eGFP después de 24 h de cocultivo (E:T = 10:1) usando el sistema de imágenes de células vivas IncuCyte®. Las imágenes de los pocillos se escanearon con lentes de objetivo 4x al inicio del cocultivo (0 h) y 24 h después y representan la muerte del esferoide tumoral de los triplicados técnicos.

Figuras 2A-2C: Reconocimiento y lisis mediada por CAR dependiente de la dosis de células objetivo que expresan CLDN6.

Figura 2A - Se analizó la expresión de superficie de CLDN6-CAR-BBz en células T transducidas después de teñir con un anticuerpo específico de idiotipo IMAB206 conjugado con fluorocromo. Las células T no transducidas sirvieron como control negativo. Las células se activaron en linfocitos CD4+ o CD8+ individuales. Los números indicados representan la frecuencia de la población de padres (en %). Figura 2B - La expresión de la superficie de CLDN6 en células Colo699-N transfectadas con cantidades valoradas de CLDN6-RNA se analizó mediante citometría de flujo. Figura 2C - La lisis específica de células Colo699-N transfectadas con ARN por células T transducidas con CLDN6-CAR-BBz se analizó después de 12 h de cocultivo con una relación E:T de 20:1 usando el dispositivo xCELLigence. Los datos se presentan como media $\pm$ DE de triplicados técnicos.

Figuras 3A-3E: Lisis específica mediada por CLDN6-CAR de líneas de células tumorales que expresan CLDN6.

Se analizaron células T humanas transducidas con CLDN6-CAR-BBz mediante citometría de flujo y se cultivaron conjuntamente con un panel de líneas de células tumorales humanas positivas y negativas a CLDN6 de diferente origen. Figura 3A - La expresión de la superficie de CAR se evaluó mediante citometría de flujo antes de que se iniciara el cocultivo. Los números indicados representan la frecuencia de la población de origen (en %). Figura 3B - usando una relación E:T de 10:1. Figura 3C - La lisis específica se analizó mediante el sistema xCELLigence tras 12 h de cocultivo de acuerdo con la fórmula $\% \text{ lisis} = (\text{CI eGFP} - \text{CI efector}) / \text{CI eGFP} * 100$; CI: índice de celda. Los datos representan la media $\pm$ DE de los triplicados técnicos. Figura 3D - La expresión de la superficie de CLDN6 en líneas de células tumorales se analizó mediante citometría de flujo después de la tinción con un anticuerpo específico de CLDN6. Se representa el porcentaje de la población de origen. Figura 3E - Se calcularon los niveles de expresión de ARNm de CLDN6 relativos en las líneas de células tumorales usadas en (Figuras 3A-3D) de acuerdo con lo evaluado por qRT-PCR después de la normalización al gen de mantenimiento HPRT1. Las barras representan la media $\pm$ DE de los triplicados técnicos.

Figuras 4A-4C: Proliferación dependiente de la dosis mediada por CLDN6-CAR-BBz en respuesta a células objetivo que expresan CLDN6.

Células T transducidas con CAR se marcaron con CFSE y se cocultivaron con DCs

autólogas transfectadas con cantidades tituladas de lipoplejos CLDN6-ARN (ARN_(LIP)). La proliferación se analizó con base en CFSE después de 5 días de cocultivo y tinción con anticuerpos conjugados con fluorocromo contra CD4, CD8 y CAR. Figura 4A - La expresión de la superficie de CAR se evaluó mediante citometría de flujo antes de que se iniciara el cocultivo.

- 5 Los números indicados representan la frecuencia de la población de origen (en %). Figura 4B - La expresión de CLDN6 en la superficie de las DCs transfectadas se evaluó mediante citometría de flujo usando un anticuerpo específico de CLDN6 conjugado con fluorocromo. Figura 4C - La proliferación específica se analizó mediante citometría de flujo a base de la dilución del tinte de proliferación CFSE. Las barras muestran el porcentaje de células T CD8+ y CD4+ que expresan CAR en proliferación.

Figuras 5A-5D: Células T transducidas con actividad antitumoral CLDN6-CAR-BBz en un modelo de tumor de xenoinjerto de cáncer de ovario avanzado (OV90).

- Se injertaron subcutáneamente 5×10^6 células tumorales OV90-SC12 25 días antes de la transferencia de células adoptivas (ACT) de una dosis única de 1×10^7 i.v. de células T humanas transducidas con CLDN6-CAR-BBz o eGFP administradas (n = 10/grupo). En este momento del tratamiento con células T, los ratones ya presentaban tumores avanzados de 170 mm³ en promedio. El volumen del tumor se determinó tres veces por semana usando un calibre y se calculó de acuerdo con la fórmula $V = \frac{1}{2} (\text{largo} \times \text{ancho}^2)$ con el largo y ancho máximo de los tumores. Los animales se sacrificaron cuando el volumen del tumor excedió los 1500 mm³ o cuando el tumor se ulceró. Figura 5A - Descripción esquemática del experimento llevado a cabo con ratones. Figura 5B - La expresión transgénica (GFP o CAR) de células T CD4+ y CD8+ humanas transducidas se analizó mediante citometría de flujo el día de ACT. Los números indicados representan la frecuencia de la población de origen (en %). Figura 5C - Se muestran los volúmenes tumorales medios en animales tratados con células CLDN6-CAR-BBz y eGFP-T después de ACT (indicado como línea de puntos) hasta el día 44. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM de todos los ratones/grupo. Figura 5D - Se analizó la persistencia de las células T y la expresión de la superficie de CAR en sangre periférica 3 semanas después de ACT usando citometría de flujo. Se muestran diagramas de puntos representativos. Los números indicaron la frecuencia de las poblaciones de origen.

Figuras 6A y 6B: Eliminación repetitiva de esferoides tumorales por células T CLDN6-CAR cultivadas de 7 y 10 días.

- Se evaluó el potencial de las células T transducidas con CLDN6-CAR generadas en 7 y 10 días, respectivamente, para matar repetitivamente esferoides tumorales que expresan CLDN6 y eGFP de acuerdo con lo evaluado por imágenes de células vivas. Figura 6A - Se analizó la expresión de la superficie CAR de células T CLDN6-CAR cultivadas de 7 días y 10 días en células T transducidas después de teñir con un anticuerpo específico de idiotipo

IMAB206 conjugado con fluorocromo. Las células T no transducidas sirvieron como control negativo. Las células se activaron en linfocitos CD4+ o CD8+ individuales. Los números indicados representan la frecuencia de la población de origen (en %). Figura 6B - La prueba funcional de células T CLDN6-CAR T cultivadas de 7 días y 10 días se llevó a cabo usando el ensayo de esferoide tumoral PA1-SC12-A2-eGFP. La lisis de los esferoides tumorales se analizó en función de la expresión de eGFP usando el sistema de imágenes de células vivas IncuCyte® durante un período de tiempo total de 10 días. Después de 5 días se añadió un nuevo esferoide tumoral. Los valores representan las intensidades integradas del objeto verde de los triplicados técnicos como media $\pm$ DE.

Figuras 7A-7D: Eficacia antitumoral de células T CLDN6-CAR fabricadas con GMP

Se injertaron subcutáneamente 5×10^6 células tumorales OV90-SC12 35 días antes de la transferencia adoptiva de una dosis única de 1×10^7 CLDN6-CAR-BBz o células T humanas no transducidas i.v. ($n = 12/\text{grupo}$). Los productos de células T usados se fabricaron en las instalaciones de GMP en un estándar (diez días de cultivo *in vitro*) o en un procedimiento de fabricación abreviado (ya se recolectaron después de siete días). Las células T no transducidas, que se trataron de la misma forma que las células T transducidas, se usaron como control negativo. Los productos de células T indicados se descongelaron, lavaron con PBS y se inyectaron directamente en los ratones, que ya presentaban tumores avanzados de 160 mm^3 en promedio. El volumen del tumor se determinó tres veces por semana usando un calibre y se calculó de acuerdo con la fórmula $V = \frac{1}{2} (\text{largo} \times \text{ancho}^2)$ con el largo y ancho máximo de los tumores. Los animales se sacrificaron cuando el volumen del tumor excedió los 1500 mm^3 o cuando el tumor se ulceró. Figura 7A - Descripción esquemática del experimento llevado a cabo con ratones. Figura 7B - La expresión de la superficie de CAR en células T CD4+ y CD8+ humanas transducidas se analizó mediante citometría de flujo el día de ACT. Los números indicados representan la frecuencia de la población de origen (en %). Figura 7C - Se muestran los volúmenes tumorales en animales tratados con células T CLDN6-CAR-BBz y control hasta el día 57. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM de todos los ratones/grupo. Figura 7D - Se analizó la persistencia de las células T y la expresión de la superficie de CAR en sangre periférica 2 semanas después de ACT usando citometría de flujo. Se muestran diagramas de puntos representativos. Los números indicaron la frecuencia de las poblaciones de origen.

Figuras 8A y 8B: La expansión *in vivo* a través de ARN_(LIP) conduce a una mayor persistencia de las células T CLDN6-CAR-BBz

Ratones C57BL/6BrdCrHsd-Tyr^c irradiados (XRAD320) con 2.5 Gy ($n = 2-3/\text{grupo}$) fueron injertados i.v. con 5×10^6 células T C57B1/6-Thy1.1⁺ transducidas con CLDN6-CAR-BBz-Luc-GFP. Ocho días después de ACT, los ratones recibieron hCLDN6 u Oval (ctrl RNA) que codifica para la vacunación con lipoplejo de ARNm (ARN_(LIP); 20 μg , i.v.) seguido de

administración i.p. de ARN formulado con nucleósido modificado que codifica para albúmina murina (1 µg/ARNm/ratón). La vacunación se repitió los días 15, 22, 50 y 85. Se llevó a cabo imagenología de bioluminiscencia secuencial para controlar la expansión y la persistencia en el día 1 (línea de base) hasta el día 92 después de ACT. Figura 8A - Descripción esquemática del experimento llevado a cabo con ratones. Figura 8B - Ejemplo de imagenología de bioluminiscencia de ratones en posición lateral en el momento indicado después de ACT y tratamiento con ARN_(LIP) de antígeno. Las imágenes descoloridas representan la intensidad de la luz (negro, menos intenso; blanco hasta gris oscuro, más intenso) que se superpuso sobre las imágenes de referencia en escala de grises. Figura 8C - Se muestra la cuantificación de la bioluminiscencia durante y después de las rondas de expansión con CLDN6-RNA_(LIP)/ctrl-RNA_(LIP) en presencia de RNAs de citocinas formulados modificados con nucleósidos indicados (media +/- s.e.m.). Las líneas verticales grises indican el momento de la vacunación con ARN_(LIP). ACT: transferencia de células T adoptivas, TBI: irradiación corporal total, BLI: imagenología de bioluminiscencia, Luc: luciferasa de luciérnaga efectiva, BBz: 4-1BB; z: CD3zeta.

Figuras 9A y 9B: Actividad antitumoral mejorada de células T CLDN6-CAR-BBz expandidas *in vivo*

Se injertaron subcutáneamente 5×10^5 células tumorales CT26 en ratones Balb/c 20 días antes de la irradiación corporal total con 4 Gy y 26 días antes de la ACT de una dosis única i.v. de 1×10^6 de células T Balb/c-Thy1.1+ transducidas con CLDN6-CAR-BBz o ctrl-CAR-BBz (n = 10/grupo). En el momento del tratamiento con células T, los ratones presentaron tumores establecidos de aprox. 80 mm³ en promedio. El volumen del tumor se determinó tres veces por semana usando un calibre y se calculó de acuerdo con la fórmula $V = \frac{1}{2} (\text{largo} \times \text{ancho}^2)$ con el largo y ancho máximo de los tumores. Figura 9A - Descripción esquemática del experimento llevado a cabo con ratones. Figura 9B - Se muestran los volúmenes tumorales medios en animales tratados con células CLDN6-CAR-BBz y ctrl-CAR-BBz-T hasta el día 40. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM de todos los ratones/grupo. ACT se indica como línea de puntos y el tratamiento con ARN_(LIP) como línea gris.

Figuras 10A-10D: Eficacia antitumoral restaurada de células T CLDN6-CAR expandidas *in vivo* en dosis bajas

Se injertaron subcutáneamente 5×10^6 células tumorales OV90-SC12 30 días antes de la ACT de una dosis única de CLDN6-CAR-BBz de dosis baja (1×10^5) o de dosis alta (1×10^6) o 1×10^7 de células T humanas no transducidas i.v. (n = 9/grupo). Los productos de células T usados se fabricaron de acuerdo con el proceso de transducción abreviado (recolectadas ya después de 7 días) en las instalaciones de GMP. Las células T no transducidas, que se trataron de la misma forma que las células T transducidas, se usaron como control negativo. Los

productos de células T indicados se descongelaron, se lavaron con PBS y se inyectaron directamente en ratones portadores de tumores. Además, los ratones que recibieron una dosis baja de células T con CAR se vacunaron adicionalmente con 20 µg de ARN_(LIP) que codificaba para CLDN6 o un antígeno de control como se indica. El volumen del tumor se determinó tres veces por semana usando un calibre y se calculó de acuerdo con la fórmula $V = \frac{1}{2} (\text{largo} \times \text{ancho}^2)$ con el largo y ancho máximo de los tumores. Los animales se sacrificaron cuando el volumen del tumor excedió los 1500 mm³ o cuando el tumor se ulceró. Figura 10A - Descripción esquemática del experimento llevado a cabo con ratones. Figura 10B - La expresión de la superficie de CAR en células T CD4⁺ y CD8⁺ humanas transducidas se analizó mediante citometría de flujo el día de la transferencia adoptiva. Los números indicados representan la frecuencia de la población de origen (en %). Figura 10C - Curvas de crecimiento tumoral de animales tratados con diferentes dosis de CLDN6-CAR-BBz +/- ARN_(LIP) o células T de control. Los datos se presentan como media ± SEM de todos los ratones/grupo. ACT se indica como línea de puntos y el tratamiento con ARN_(LIP) como líneas grises. Figura 10D - Se analizó la persistencia de las células T y la expresión de la superficie de CAR en sangre periférica 2.5 semanas después de la ACT usando citometría de flujo. Se muestran diagramas de puntos representativos. Los números indicaron la frecuencia de las poblaciones de origen.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se refiere a composiciones y métodos para tratar el cáncer que incluyen, pero no se limitan a, tumores sólidos. La presente invención se refiere a una estrategia de transferencia celular adoptiva de células tales como células T transducidas para expresar un CAR. Los CARs son moléculas que combinan la especificidad por un antígeno deseado (por ejemplo, antígeno tumoral) que preferiblemente es a base de anticuerpos con un dominio intracelular que activa el receptor de células T para generar una proteína quimérica que exhiba una actividad inmune celular específica (por ejemplo, actividad inmunitaria celular tumoral). Preferiblemente, una célula puede modificarse genéticamente para expresar de manera estable un CAR en su superficie, lo que confiere una nueva especificidad de antígeno que es independiente de MHC. La presente invención se refiere en general a células T genéticamente modificadas para expresar de forma estable un CAR deseado. Las células T que expresan un CAR se denominan en el presente documento células T con CAR o células T modificadas con CAR.

Un CAR de la invención combina un dominio de unión al antígeno CLDN6, preferiblemente un dominio de un anticuerpo específico, y un dominio intracelular que comprende un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de la cadena CD3-zeta en una sola proteína quimérica. En una modalidad, el CAR de la invención comprende un dominio extracelular que comprende un dominio de unión al antígeno CLDN6, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que comprende un dominio coestimulador 4-1BB y un

dominio de cadena CD3-zeta. En una modalidad, el dominio transmembrana no está asociado de forma natural con uno de los dominios del CAR. En una modalidad, el dominio transmembrana está asociado de forma natural con uno de los dominios del CAR. En una modalidad, el dominio transmembrana se modifica mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas proteínas de membrana de superficie o diferentes para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. Preferiblemente, el dominio transmembrana se deriva de CD8 α .

La invención proporciona además células T con CAR y métodos para su uso para terapia adoptiva. En una modalidad, las células T con CAR de la invención se pueden generar mediante la introducción de un vector retroviral tal como lentiviral que comprende un CAR deseado, por ejemplo, un CAR que comprende anti-CLDN6, bisagra CD8 α y dominio transmembrana, y dominios de señalización 4-1BB y CD3zeta, en las células. Las células T con CAR de la invención preferiblemente pueden replicarse *in vivo* dando como resultado una persistencia a largo plazo que puede conducir a un control tumoral sostenido.

En una modalidad, la invención se refiere a la administración de una célula T genéticamente modificada que expresa un CAR deseado para el tratamiento de un paciente que tiene cáncer o que está en riesgo de tener cáncer. Preferiblemente, se usan células autólogas en el tratamiento. En una modalidad, PBMCs autólogas se recolectan de un paciente que necesita tratamiento y las células T se activan y expanden usando los métodos descritos en este documento y conocidos en la técnica y luego se infunden de nuevo en el paciente.

En una modalidad, la invención se refiere en general al tratamiento de un paciente que tiene o está en riesgo de desarrollar cáncer que expresa CLDN6. La invención incluye el uso de células T que expresan un anti-CLDN6-CAR que incluye tanto CD3-zeta como el dominio coestimulador 4-1BB. Las células T con CAR de la invención pueden experimentar una expansión de células T *in vivo* robusta, en particular si se ponen en contacto con su antígeno afín, y pueden persistir a niveles elevados durante un período de tiempo prolongado. En algunos casos, las células T con CAR de la invención infundidas en un paciente pueden eliminar las células cancerosas *in vivo* en los pacientes.

Definiciones

Aunque la presente invención se describe en detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos en este documento, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en este documento tiene el propósito de describir únicamente modalidades particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen los mismos significados que los entendidos

comúnmente por un experto en la técnica.

A continuación, se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con modalidades específicas, sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear modalidades adicionales.

- 5 Los ejemplos y las modalidades preferidas descritas de diversas formas no deben interpretarse como que limitan la presente invención únicamente a las modalidades descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción apoya y engloba las modalidades que combinan las modalidades descritas explícitamente con cualquier número de los elementos descritos y/o preferidos. Además, cualquier permutaciones y combinaciones de todos los elementos
- 10 descritos en esta solicitud deben considerarse dadas a conocer por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto indique lo contrario.

- A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque cualquier método y material
- 15 similar o equivalente a los descritos en este documento puede usarse en la práctica para probar la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen en este documento. Al describir y reivindicar la presente invención, se usará la siguiente terminología.

- A lo largo de esta especificación y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprenden" y variaciones tales como "comprende" y "comprendiendo" implican la inclusión de un miembro, número entero o
- 20 paso o grupo indicado de miembros, números enteros o pasos pero sin la exclusión de cualquier otro miembro, número entero o paso o grupo de miembros, números enteros o pasos aunque en algunas modalidades dicho otro miembro, número entero o paso o grupo de miembros, números enteros o pasos pueden ser excluidos, es decir, la materia consiste en la inclusión de
- 25 un miembro, número entero o paso o grupo de miembros, números enteros o pasos establecidos.

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

- 30 "Aproximadamente" como se usa en este documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, incluso más preferiblemente $\pm 1\%$, y aún más preferiblemente $\pm 0.1\%$ del valor especificado.

- El término "anticuerpo", tal como se usa en este documento, se refiere a una molécula
- 35 de inmunoglobulina que se une, preferiblemente se une específicamente con un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes

recombinantes y pueden ser porciones o fragmentos inmunorreactivos de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos son típicamente tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos de la presente invención pueden existir en una variedad de formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab)2, así como anticuerpos monocatenarios y anticuerpos humanizados (Harlow et al., 1999, En: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, en: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242: 423-426).

Los anticuerpos expresados por las células B a veces se denominan BCR (receptor de células B) o receptor de antígeno. Los cinco miembros incluidos en esta clase de proteínas son IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. La IgA es el anticuerpo principal que está presente en las secreciones corporales, tal como la saliva, las lágrimas, la leche materna, las secreciones gastrointestinales y las secreciones mucosas de los tractos respiratorio y genitourinario. La IgG es el anticuerpo circulante más común. La IgM es la principal inmunoglobulina producida en la respuesta inmune primaria en la mayoría de los sujetos. Es la inmunoglobulina más eficaz en la aglutinación, la fijación del complemento y otras respuestas de anticuerpos, y es importante en la defensa contra bacterias y virus. La IgD es la inmunoglobulina que no tiene una función de anticuerpo conocida, pero que puede servir como receptor de antígeno. La IgE es la inmunoglobulina que media la hipersensibilidad inmediata al provocar la liberación de mediadores de los mastocitos y basófilos tras la exposición al alérgeno.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y típicamente comprende las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto.

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

Una "cadena pesada de anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere al mayor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales.

Una "cadena ligera de anticuerpo", tal como se usa en este documento, se refiere al más pequeño de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales, las cadenas ligeras κ y λ se refieren a los dos isotipos principales de cadena ligera de anticuerpos.

El término "antígeno" o "Ag" como se usa en este documento se define como una molécula que provoca una respuesta inmune. Esta respuesta inmune puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes

específicas, o ambas. El experto en la materia comprenderá que cualquier macromolécula, incluidas prácticamente todas las proteínas o péptidos, puede servir como antígeno. Además, los antígenos pueden ser antígenos de origen natural o recombinantes.

En el contexto de la presente invención, el término "antígeno tumoral" se refiere a antígenos que son comunes a trastornos hiperproliferativos específicos como el cáncer.

Las claudinas son proteínas integrales de membrana ubicadas dentro de las uniones estrechas de epitelio y endotelio. Se predice que las claudinas tienen cuatro segmentos transmembrana con dos bucles extracelulares y extremos N y C ubicados en el citoplasma. El primer bucle extracelular, denominado EC1 o ECL1, consiste en un promedio de 53 aminoácidos, y el segundo bucle extracelular, denominado EC2 o ECL2, consiste en alrededor de 24 aminoácidos. La familia Claudina (CLDN) de proteínas transmembrana desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de las uniones estrechas epiteliales y endoteliales y también podría desempeñar un papel en el mantenimiento del citoesqueleto y en señalización celular.

La claudina 6 (CLDN6) es un gen oncofetal expresado en células madre murinas y humanas, así como en cuerpos embrioides comprometidos con el destino de las células epiteliales (Turksen, K. et al. (2001) Dev Dyn 222, 292-300; Anderson WJ. et al. (2001) Dev Dyn 222, 292-300; Anderson WJ. et al. (2008) Dev Dyn 237, 504-12; Turksen K. et al. (2002) Development, 129, 1775-84; Assou S. et al. (2007) Stem Cells 25, 961-73). Como antígeno asociado a tumores, puede clasificarse como un antígeno de diferenciación debido a su expresión durante la etapa temprana de la morfogénesis epidérmica, en donde es crucial para la diferenciación epidérmica y la formación de barreras. Además, se observó expresión en tejidos epiteliales o tejido epitelial normal neonatal de lengua, piel, estómago y mama (Abuazza G. et al. (2006), Am J Physiol Renal Physiol 291, 1132-1141; Troy TC et al. (2007), Molecular Biotechnology 36, 166-74; Zhao L. et al. (2008), Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 294, 1856-1862). Además de eso, los propios datos también revelan una expresión baja o muy baja de CLDN6 en placenta humana, vejiga urinaria, endometrio, próstata y el nervio periférico y sobreexpresión frecuente de CLDN6 en diferentes cánceres. Se ha demostrado que CLDN6 se sobreexpresa en tumores, incluidos tumores cerebrales pediátricos, adenocarcinomas gástricos y tumores de células germinales, así como carcinomas viscerales como los carcinomas de ovario. También se ha demostrado que la sobreexpresión de CLDN6 en células de cáncer gástrico da como resultado una mayor invasividad, migración y proliferación, lo que sugiere que CLDN6 es un marcador de mal pronóstico y puede desempeñar un papel potencial en el mantenimiento del fenotipo maligno. Además, se ha demostrado que CLDN6 funciona como supresor del cáncer mediante la inhibición de la proliferación celular y la inducción de apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama.

Se ha encontrado que CLDN6 se expresa, por ejemplo, en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer de piel, melanomas, cáncer de cabeza y cuello, sarcomas, cáncer de vías biliares, cáncer de células renales y cáncer de vejiga urinaria. CLDN6 es un objetivo particularmente preferido para la

5 prevención y/o el tratamiento del cáncer de ovario, en particular el adenocarcinoma de ovario y el teratocarcinoma de ovario, el cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), en particular el carcinoma y adenocarcinoma de pulmón de células escamosas, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer de piel, en particular carcinoma de células

10 basales y carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular sinovial sarcoma y carcinosarcoma, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga urinaria, en particular carcinoma de células de transición y carcinoma papilar, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales incluyendo carcinoma de células renales de células claras y carcinoma de células

15 renales papilares, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, incluyendo cáncer del íleon, en particular adenocarcinoma de intestino delgado y adenocarcinoma del íleon, carcinoma embrionario testicular, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino, cáncer de testículo, en particular seminoma testicular, teratoma testicular y cáncer de testículo embrionario, cáncer de útero, tumores de células germinales tal como un teratocarcinoma o carcinoma embrionario,

20 en particular tumores de células germinales del testículo, y las formas metastásicas de los mismos. En una modalidad, la enfermedad cancerosa asociada con la expresión de CLDN6 se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de ovario metastásico y cáncer de pulmón metastásico. Preferiblemente, el cáncer de ovario es un carcinoma o un adenocarcinoma. Preferiblemente, el cáncer de pulmón es un carcinoma o un

25 adenocarcinoma, y preferiblemente es un cáncer bronquiolar tal como un carcinoma bronquiolar o un adenocarcinoma bronquiolar.

El término "CLDN6" se refiere preferiblemente a CLDN6 humano y, en particular, a una proteína que comprende, preferiblemente que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 de la lista de secuencias o una variante de dicha amino secuencia

30 ácida. El primer bucle extracelular de CLDN6 comprende preferiblemente los aminoácidos 28 a 80, más preferiblemente los aminoácidos 28 a 76 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2. El segundo bucle extracelular de CLDN6 comprende preferiblemente los aminoácidos 138 a 160, preferiblemente los aminoácidos 141 a 159, más preferiblemente los aminoácidos 145 a 157 de la secuencia de

35 aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2. Dichos primeros y segundos bucles extracelulares forman preferiblemente

la porción extracelular de CLDN6.

El término "expresado en la superficie celular" o "asociado con la superficie celular" significa que una molécula como CLDN6 está asociada y ubicada en la membrana plasmática de una célula, en donde al menos una parte de la molécula se enfrenta al espacio extracelular de dicha célula y es accesible desde el exterior de dicha célula, por ejemplo, mediante anticuerpos ubicados fuera de la célula. En este contexto, una parte es preferiblemente al menos 4, preferiblemente al menos 8, preferiblemente al menos 12, más preferiblemente al menos 20 aminoácidos. La asociación puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, la asociación puede ser por uno o más dominios transmembrana, uno o más anclajes de lípidos, o por la interacción con cualquier otra proteína, lípido, sacárido u otra estructura que se pueda encontrar en la valva exterior de la membrana plasmática de un célula. Por ejemplo, una molécula asociada con la superficie de una célula puede ser una proteína transmembrana que tenga una porción extracelular o puede ser una proteína asociada con la superficie de una célula al interactuar con otra proteína que sea una proteína transmembrana.

"Superficie celular" o "superficie de una célula" se usa de acuerdo con su significado normal en la técnica y, por lo tanto, incluye el exterior de la célula que es accesible para la unión de proteínas y otras moléculas.

"Inmunidad mediada por células", "inmunidad celular", "respuesta inmune celular" o términos similares pretenden incluir una respuesta celular dirigida a células caracterizadas por la expresión de un antígeno, en particular caracterizada por la presentación de un antígeno de clase I o clase II MHC. La respuesta celular se relaciona con células llamadas células T o células T que actúan como "ayudantes" o "asesinos". Las células T auxiliares (también denominadas células T CD4⁺) desempeñan un papel central al regular la respuesta inmune y las células asesinas (también denominadas células T citotóxicas, células T citolíticas, células T CD8⁺ o CTLs) matan células enfermas como las células cancerosas, previniendo la producción de más células enfermas.

El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico en una molécula tal como un antígeno, es decir, a una parte o fragmento de la molécula, que es reconocido, es decir unido, por el sistema inmunológico, por ejemplo, que es reconocido por un anticuerpo o CAR. Por ejemplo, los epítipos son los sitios tridimensionales discretos en un antígeno, que son reconocidos por el sistema inmunológico. Los epítipos normalmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero pero no al segundo se pierde en presencia de solventes desnaturizantes. Preferiblemente, un epítipo es capaz de provocar

una respuesta inmune contra el antígeno o una célula que expresa el antígeno. Preferiblemente, el término se refiere a una porción inmunogénica de un antígeno. Un epítipo de una proteína tal como un antígeno tumoral comprende preferiblemente una porción continua o discontinua de dicha proteína y está preferiblemente entre 5 y 100, preferiblemente entre 5 y 50, más
5 preferiblemente entre 8 y 30, lo más preferiblemente entre 10 y 25 aminoácidos en de longitud, por ejemplo, el epítipo puede tener preferiblemente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud.

"Procesamiento de antígenos" se refiere a la degradación de un antígeno en productos de la procesión, que son fragmentos de dicho antígeno (por ejemplo, La degradación de una
10 proteína en péptidos) y la asociación de uno o más de estos fragmentos (por ejemplo, mediante unión) con moléculas MHC para presentación por las células, preferiblemente células presentadoras de antígenos a células T específicas.

Una célula presentadora de antígeno (APC) es una célula que muestra antígeno en el contexto de un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en su superficie. Las células T
15 pueden reconocer este complejo usando su receptor de células T (TCR). Las células presentadoras de antígenos procesan los antígenos y los presentan a las células T. De acuerdo con la invención, el término "célula presentadora de antígenos" incluye células presentadoras de antígenos profesionales y células presentadoras de antígenos no profesionales.

Las células presentadoras de antígenos profesionales son muy eficientes para
20 internalizar el antígeno, ya sea por fagocitosis o por endocitosis mediada por receptor, y luego exhiben un fragmento del antígeno, unido a una molécula del MHC de clase II, en su membrana. La célula T reconoce e interactúa con el complejo de moléculas MHC de clase II de antígeno en la membrana de la célula presentadora de antígeno. A continuación, la célula presentadora de antígeno produce una señal coestimuladora adicional, que conduce a la activación de la célula
25 T. La expresión de moléculas coestimuladoras es una característica definitoria de las células presentadoras de antígenos profesionales. Los principales tipos de células presentadoras de antígenos profesionales son las células dendríticas, que tienen el rango más amplio de presentación de antígenos, y son probablemente las células presentadoras de antígenos, los macrófagos, las células B y ciertas células epiteliales activadas más importantes.

El término "macrófago" se refiere a un subgrupo de células fagocíticas producidas por
30 la diferenciación de monocitos. Los macrófagos que se activan por inflamación, citocinas inmunes o productos microbianos engloban y matan de manera inespecífica patógenos extraños dentro del macrófago mediante un ataque hidrolítico y oxidativo que da como resultado la degradación del patógeno. Los péptidos de las proteínas degradadas se muestran en la
35 superficie de las células de los macrófagos, en donde pueden ser reconocidos por las células T y pueden interactuar directamente con los anticuerpos en la superficie de las células B, lo que

da como resultado la activación de las células T y B y una mayor estimulación de la respuesta inmune. Los macrófagos pertenecen a la clase de células presentadoras de antígenos. En una modalidad, los macrófagos son macrófagos esplénicos.

El término "célula dendrítica" (DC) se refiere a otro subtipo de células fagocíticas que pertenecen a la clase de células presentadoras de antígenos. En una modalidad, las células dendríticas se derivan de células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea. Estas células progenitoras se transforman inicialmente en células dendríticas inmaduras. Estas células inmaduras se caracterizan por una alta actividad fagocítica y un bajo potencial de activación de las células T. Las células dendríticas inmaduras muestrean constantemente el entorno circundante en busca de patógenos tales como virus y bacterias. Una vez que entran en contacto con un antígeno presentable, se activan en células dendríticas maduras y comienzan a migrar al bazo o al ganglio linfático. Las células dendríticas inmaduras fagocitan patógenos y degradan sus proteínas en pequeños trozos y, al madurar, presentan esos fragmentos en su superficie celular usando moléculas MHC. Al mismo tiempo, regulan positivamente los receptores de la superficie celular que actúan como correceptores en la activación de las células T, tal como CD80, CD86 y CD40, lo que mejora en gran medida su capacidad para activar las células T. También regulan al alza CCR7, un receptor quimiotáctico que induce a la célula dendrítica a viajar a través del torrente sanguíneo hasta el bazo o por el sistema linfático hasta un ganglio linfático. Aquí actúan como células presentadoras de antígenos y activan las células T auxiliares y las células T asesinas, así como las células B al presentarles antígenos, junto con señales coestimuladoras no específicas de antígeno. Por lo tanto, las células dendríticas pueden inducir activamente una respuesta inmunitaria relacionada con las células T o B. En una modalidad, las células dendríticas son células dendríticas esplénicas.

De acuerdo con la invención, el término "CAR" (o "receptor de antígeno quimérico") se refiere a un receptor artificial que comprende una sola molécula o un complejo de moléculas que reconoce, es decir, se une a, una estructura objetivo (por ejemplo, un antígeno) en una célula objetivo tal como una célula cancerosa (por ejemplo, mediante la unión de un dominio de unión a antígeno a un antígeno expresado en la superficie de la célula objetivo) y puede conferir especificidad a una célula efectora inmunitaria tal como una célula T que exprese dicho CAR en la superficie celular. Preferiblemente, el reconocimiento de la estructura objetivo por un CAR da como resultado la activación de una célula efectora inmunitaria que expresa dicho CAR. Un CAR puede comprender una o más unidades de proteína, en donde dichas unidades de proteína comprendan uno o más dominios como los descritos en el presente documento. El término "CAR" no incluye los receptores de células T.

La terapia de transferencia celular adoptiva con células T modificadas con CAR que

expresan receptores de antígenos quiméricos es una terapéutica anticáncer prometedora, ya que las células T modificadas con CAR pueden diseñarse para dirigirse a prácticamente cualquier antígeno tumoral. Por ejemplo, las células T del paciente pueden modificarse mediante ingeniería genética (modificadas genéticamente) para expresar CARs dirigidos específicamente hacia los antígenos de las células tumorales del paciente, y luego volver a infundirse en el paciente.

El término "antitumoral" como se usa en este documento, se refiere a un efecto biológico que puede manifestarse por una disminución en el volumen del tumor, una disminución en el número de células tumorales, una disminución en el número de metástasis, una prevención de la aparición de tumor en primer lugar, un aumento en la esperanza de vida o una mejoría de varios síntomas fisiológicos asociados con la condición cancerosa.

Como se usa en el presente documento, el término "autólogo" se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo al que posteriormente se volverá a introducir en el individuo.

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

El término "singénico" se usa para describir cualquier cosa que se derive de individuos o tejidos que tienen genotipos idénticos, es decir, gemelos idénticos o animales de la misma cepa endogámica, o sus tejidos.

El término "cáncer", tal como se usa en este documento, se define como una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido y descontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden diseminarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Los ejemplos de varios cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares.

Como se usa en el presente documento, los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente y se refieren a un compuesto que comprende residuos de aminoácido unidos covalentemente por enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se impone ninguna limitación al número máximo de aminoácidos que pueden comprender la secuencia de una proteína o péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Como se usa en el presente documento, el término se refiere tanto a cadenas cortas, que también se denominan comúnmente en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, y a cadenas más largas, que generalmente se denominan en la técnica proteínas, de las cuales hay muchos tipos. Los "polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos

biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o una combinación de los mismos.

5 El término "polinucleótido" como se usa en este documento se define como una cadena de nucleótidos. Además, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por lo tanto, los ácidos nucleicos y polinucleótidos como se usan en este documento son intercambiables. Un experto en la técnica tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que pueden hidrolizarse en los "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos
10 monoméricos se pueden hidrolizar en nucleósidos. Como se usa en este documento, los polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen por cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo, sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico de una biblioteca recombinante o un genoma celular, usando tecnología de clonación ordinaria y PCR™, y
15 similares, y por medios sintéticos. El término "polinucleótido", tal como se usa en el presente documento, debe interpretarse de manera amplia e incluye ADN y ARN, incluidos ADN y ARN modificados.

En la presente invención, el término "ARN" se refiere a una molécula de ácido nucleico que incluye residuos de ribonucleótidos. En modalidades preferidas, el ARN contiene todos o
20 la mayoría de los residuos de ribonucleótidos. Como se usa en el presente documento, "ribonucleótido" se refiere a un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo β -D-ribofuranosilo. El ARN incluye, sin limitación, ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN aislado como ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido de manera recombinante, así como ARN modificado que se diferencia del ARN
25 natural por la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden referirse a la adición de material no nucleotídico a los nucleótidos internos del ARN o al (los) extremo (s) del ARN. También se contempla en el presente documento que los nucleótidos en el ARN pueden ser nucleótidos no estándar, tales como nucleótidos o desoxinucleótidos sintetizados químicamente. Para la presente invención, estos ARN alterados
30 se consideran análogos de ARN de origen natural.

En ciertas modalidades de la presente invención, el ARN es ARN mensajero (ARNm) que se relaciona con una transcripción de ARN que codifica para un péptido o proteína. Como se establece en la técnica, el ARNm generalmente contiene una región no traducida 5' (5'-UTR), una región codificadora de péptidos y una región no traducida 3' (3'-UTR). En algunas
35 modalidades, el ARN se produce mediante transcripción *in vitro* o síntesis química. En una modalidad, el ARNm se produce mediante transcripción *in vitro* usando una plantilla de ADN en

la que ADN se refiere a un ácido nucleico que contiene desoxirribonucleótidos.

En una modalidad, el ARN es ARN transcrito *in vitro* (IVT-ARN) y puede obtenerse mediante la transcripción *in vitro* de una plantilla de ADN apropiada. El promotor para controlar la transcripción puede ser cualquier promotor de cualquier ARN polimerasa. Puede obtenerse
 5 una plantilla de ADN para la transcripción *in vitro* clonando un ácido nucleico, en particular ADNc, e introduciéndolo en un vector apropiado para la transcripción *in vitro*. El ADNc puede obtenerse mediante transcripción inversa de ARN.

En una modalidad, el ARN puede tener ribonucleótidos modificados. Los ejemplos de ribonucleótidos modificados incluyen, sin limitación, 5-metilcitidina, pseudouridina y/o 1-metil-
 10 pseudouridina.

En algunas modalidades, el ARN de acuerdo con la presente invención comprende una tapa 5'. En una modalidad, el ARN de la presente invención no tiene 5'-trifosfatos sin tapar. En una modalidad, el ARN puede modificarse mediante un análogo de tapa 5'. El término "tapa 5'" se refiere a una estructura que se encuentra en el extremo 5' de una molécula de ARNm y
 15 generalmente consiste en un nucleótido de guanosina conectado al ARNm mediante un enlace trifosfato 5' a 5'. En una modalidad, esta guanosina está metilada en la posición 7. Proporcionar un ARN con una tapa 5' o un análogo de tapa 5' se puede lograr mediante transcripción *in vitro*, en la que la tapa 5' se expresa co-transcripcionalmente en la hebra de ARN, o se puede unir al ARN post-transcripcionalmente usando taponamiento de enzimas.

En algunas modalidades, el ARN de acuerdo con la presente invención comprende una
 20 5'-UTR y/o una 3'-UTR. El término "región no traducida" o "UTR" se refiere a una región en una molécula de ADN que se transcribe pero no se traduce en una secuencia de aminoácidos, o a la región correspondiente en una molécula de ARN, tal como una molécula de ARNm. Una región no traducida (UTR) puede estar presente 5' (cadena arriba) de un marco de lectura
 25 abierto (5'-UTR) y/o 3' (cadena abajo) de un marco de lectura abierto (3'-UTR). Un 5'-UTR, si está presente, está ubicado en el extremo 5', cadena arriba del codón de inicio de una región que codifique para una proteína. Un 5'-UTR está cadena debajo de la tapa 5' (si está presente), por ejemplo, directamente adyacente a la tapa 5'. Una 3'-UTR, si está presente, está ubicada en el extremo 3', cadena abajo del codón de terminación de una región que codifica para una
 30 proteína, pero el término "3'-UTR" preferiblemente no incluye la cola poli(A). Por lo tanto, la 3'-UTR está cadena arriba de la secuencia de poli(A) (si está presente), por ejemplo, directamente adyacente a la secuencia de poli(A).

En algunas modalidades, el ARN de acuerdo con la presente invención comprende una
 35 secuencia de 3'-poli(A). El término "secuencia poli(A)" se refiere a una secuencia de residuos de adenilo (A) que normalmente se encuentra en el extremo 3' de una molécula de ARN. De acuerdo con la invención, en una modalidad, una secuencia de poli(A) comprende al menos

aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 80, o al menos aproximadamente 100, y hasta aproximadamente 500, hasta aproximadamente 400, hasta aproximadamente 300, hasta aproximadamente 200 o hasta aproximadamente 150 nucleótidos A, y en particular aproximadamente 120 nucleótidos A.

5 "Codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia de nucleótidos definida (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia de aminoácidos definida y las propiedades biológicas resultantes de la misma. Por lo tanto, un
10 gen codifica para una proteína si la transcripción y traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y generalmente se proporciona en listas de secuencias, como la cadena no codificante, usada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, pueden denominarse codificantes de la proteína u otro
15 producto de ese gen o ADNc.

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

Como se usa en este documento, el término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

20 El término "expresión" como se usa en este documento se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular.

"Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos que se va a expresar. Un vector de expresión comprende
25 suficientes elementos que actúan en cis para la expresión; otros elementos para la expresión pueden ser suministrados por la célula hospedera o en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

30 "Homólogo" se refiere a la similitud de secuencia o identidad de secuencia entre dos polipéptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. Cuando una posición en las dos secuencias comparadas está ocupada por la misma subunidad de monómero de base o aminoácido, por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. El porcentaje
35 de homología entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias dividido por el número de posiciones

comparadas X 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias coinciden o son homólogas entonces las dos secuencias son homólogas en un 60%. Generalmente, se hace una comparación cuando dos secuencias se alinean para dar la máxima homología. Las secuencias homólogas presentan de acuerdo con la invención al menos el 40%, en particular al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% y preferiblemente al menos el 95%, al menos el 98 o al menos al menos 99% de identidad de los residuos de aminoácidos o nucleótidos.

Fragmento, con referencia a una secuencia de aminoácidos (péptido o proteína), se refiere a una parte de una secuencia de aminoácidos, es decir, una secuencia que representa la secuencia de aminoácidos acortada en el extremo N-terminal y/o C-terminal. Se puede obtener un fragmento acortado en el extremo C-terminal (fragmento N-terminal), por ejemplo, por traducción de un marco de lectura abierto truncado que carece del extremo 3' del marco de lectura abierto. Se puede obtener un fragmento acortado en el extremo N-terminal (fragmento C-terminal), por ejemplo, por traducción de un marco de lectura abierto truncado que carece del extremo 5' del marco de lectura abierto, siempre que el marco de lectura abierto truncado comprenda un codón de inicio que sirve para iniciar la traducción. Un fragmento de una secuencia de aminoácidos comprende, por ejemplo, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% de los residuos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos. Un fragmento de una secuencia de aminoácidos comprende preferiblemente al menos 6, en particular al menos 8, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 50 o al menos 100 aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácidos.

Por "variante" o "proteína variante" o "polipéptido variante" en el presente documento se entiende una proteína que se diferencia de una proteína original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. El polipéptido original puede ser un polipéptido natural o de tipo salvaje (WT), o puede ser una versión modificada de un polipéptido de tipo salvaje. Preferiblemente, el polipéptido variante tiene al menos una modificación de aminoácido en comparación con el polipéptido original, por ejemplo, de 1 a aproximadamente 20 modificaciones de aminoácidos, y preferiblemente de 1 a aproximadamente 10 o de 1 a aproximadamente 5 modificaciones de aminoácidos en comparación con el original.

Por "polipéptido de origen", "proteína de origen", "polipéptido precursor" o "proteína precursora", tal como se usa en el presente documento, se entiende un polipéptido no modificado que se modifica posteriormente para generar una variante. Un polipéptido de origen puede ser un polipéptido de tipo salvaje, o una variante o versión diseñada de un polipéptido de tipo salvaje.

Por "tipo salvaje" o "WT" o "nativo" en el presente documento se entiende una secuencia

de aminoácidos que se encuentra en la naturaleza, incluidas las variaciones alélicas. Una proteína o polipéptido de tipo salvaje tiene una secuencia de aminoácidos que no se ha modificado intencionalmente.

Para los propósitos de la presente invención, las "variantes" de una secuencia de aminoácidos (péptido, proteína o polipéptido) comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de adición de aminoácidos, variantes de delección de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos. El término "variante" incluye todos los mutantes, variantes de corte y empalme, variantes modificadas postraduccionalmente, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular aquellos que se encuentran en la naturaleza.

Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden inserciones de uno o dos o más aminoácidos en una secuencia de aminoácidos particular. En el caso de variantes de secuencia de aminoácidos que tienen una inserción, uno o más residuos de aminoácidos se insertan en un sitio particular en una secuencia de aminoácidos, aunque también es posible una inserción aleatoria con un tamizado apropiado del producto resultante. Las variantes de adición de aminoácidos comprenden fusiones amino- y/o carboxi-terminales de uno o más aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos. Las variantes de delección de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia, tal como por la eliminación de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos. Las delecciones pueden estar en cualquier posición de la proteína. Las variantes de delección de aminoácidos que comprenden la delección en el extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína también se denominan variantes de truncamiento N-terminal y/o C-terminal. Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan porque se elimina al menos un residuo de la secuencia y se inserta otro residuo en su lugar. Se da preferencia a que las modificaciones se encuentren en posiciones en la secuencia de aminoácidos que no se conserven entre proteínas o péptidos homólogos y/o al reemplazo de aminoácidos por otros que tengan propiedades similares. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos en variantes de péptidos y proteínas son cambios de aminoácidos conservadores, es decir, sustituciones de aminoácidos cargados o no cargados de manera similar. Un cambio de aminoácido conservador implica la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos naturales se dividen generalmente en cuatro familias: aminoácidos ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), apolares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y polares no cargados (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos. En una modalidad, las sustituciones de aminoácidos conservadoras incluyen sustituciones dentro de los siguientes

grupos:

glicina, alanina;
valina, isoleucina, leucina;
ácido aspártico, ácido glutámico;
5 asparagina, glutamina;
serina, treonina;
lisina, arginina; y
fenilalanina, tirosina.

Preferiblemente, el grado de similitud, preferiblemente identidad entre una secuencia de
10 aminoácidos dada y una secuencia de aminoácidos que es una variante de dicha secuencia de
aminoácidos dada será al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82 %, 83%,
84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%.
El grado de similitud o identidad se da preferiblemente para una región de aminoácidos que es
al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente
15 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos
aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al
menos aproximadamente 90% o aproximadamente 100% de la longitud total de la secuencia de
aminoácidos de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos de referencia consiste
en 200 aminoácidos, el grado de similitud o identidad se da preferiblemente para al menos
20 aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 60, al menos
aproximadamente 80, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al
menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente
180 o aproximadamente 200 aminoácidos, preferiblemente aminoácidos continuos. En
modalidades preferidas, el grado de similitud o identidad se da para toda la longitud de la
25 secuencia de aminoácidos de referencia. La alineación para determinar la similitud de
secuencia, preferiblemente la identidad de secuencia, se puede realizar con herramientas
conocidas en la técnica, preferiblemente usando la mejor alineación de secuencia, por ejemplo,
usando Align, usando configuraciones estándar, preferiblemente EMBOSS :: needle, Matrix:
Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5.

30 "Similitud de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que
representan sustituciones de aminoácidos conservadoras. La "identidad de secuencia" entre
dos secuencias de aminoácidos indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las
secuencias.

El término "porcentaje de identidad" está destinado a denotar un porcentaje de residuos
35 de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenidos después del
mejor alineamiento, siendo este porcentaje puramente estadístico y las diferencias entre las dos

secuencias se distribuyen aleatoriamente y sobre toda su longitud. Las comparaciones de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente comparando estas secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, en donde dicha comparación se lleva a cabo por segmento o por "ventana de comparación" para identificar y

5 comparar regiones locales de similitud de secuencia. El alineamiento óptimo de las secuencias de comparación se puede producir, además de manualmente, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482, mediante el algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, o

10 mediante programas informáticos que utilicen estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, dividiendo este número entre el número de

15 posiciones comparadas y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

El término "variante funcional", tal como se usa en este documento, se refiere a una molécula o secuencia variante que comprende una secuencia de aminoácidos que está alterada por uno o más aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la molécula o

20 secuencia original y que todavía es capaz de cumplir una o más de las funciones de la molécula o secuencia de origen, por ejemplo, unirse a una molécula objetivo o contribuir a la unión a una molécula objetivo. En una modalidad, una variante funcional sola o en combinación con otros elementos compete por unirse a una molécula objetivo con la molécula o secuencia de origen. En otras palabras, las modificaciones en la secuencia de aminoácidos de la molécula o

25 secuencia original no afectan ni alteran significativamente las características de unión de la molécula o secuencia. En diferentes modalidades, la unión de la variante funcional puede reducirse pero aún estar presente de manera significativa, por ejemplo, la unión de la variante funcional puede ser al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% de la molécula o secuencia de origen. Sin embargo, en otras modalidades, la unión de la

30 variante funcional puede mejorarse en comparación con la molécula o secuencia de origen.

Una secuencia de aminoácidos (péptido, proteína o polipéptido) "derivada" de una secuencia de aminoácidos designada (péptido, proteína o polipéptido) se refiere al origen de la primera secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos que se deriva de una secuencia de aminoácidos particular tiene una secuencia de aminoácidos que es

35 idéntica, esencialmente idéntica u homóloga a esa secuencia particular o un fragmento de la misma. Las secuencias de aminoácidos derivadas de una secuencia de aminoácidos particular

pueden ser variantes de esa secuencia particular o un fragmento de la misma.

Como se usa en este documento, un "material de instrucción" o "instrucciones" incluye una publicación, una grabación, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad de las composiciones y métodos de la invención. El material

5 instructivo del kit de la invención puede, por ejemplo, fijarse a un contenedor que contiene las composiciones de la invención o enviarse junto con un contenedor que contiene las composiciones. Como alternativa, el material instructivo puede enviarse por separado del contenedor con la intención de que el destinatario use el material instructivo y las composiciones de manera cooperativa.

10 "Aislado" significa alterado o eliminado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido presente naturalmente en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Un ácido nucleico o proteína aislado puede existir en forma sustancialmente purificada, o puede existir en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, una

15 célula hospedera.

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

Un "lentivirus" como se usa en este documento se refiere a un género de la familia

20 Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus por poder infectar células que no se dividen; pueden entregar una cantidad significativa de información genética en el ADN de la célula hospedera, por lo que son uno de los métodos más eficientes de un vector de entrega de genes. El VIH, el VIS y el VIF son todos ejemplos de lentivirus. Los vectores derivados de lentivirus ofrecen los medios para lograr niveles significativos de transferencia de genes *in vivo*.

25 El término "unido operativamente" se refiere al enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que da como resultado la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico está operativamente unida o enlazada con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido

30 nucleico. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante si el promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN operativamente enlazadas son contiguas y, cuando es necesario para unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de lectura.

El término antígeno tumoral "sobreexpresado" o "sobreexpresión" del antígeno tumoral

35 pretende indicar un nivel anormal de expresión del antígeno tumoral en una célula de un área de la enfermedad como un tumor sólido dentro de un tejido u órgano específico del paciente en

relación con el nivel de expresión en una célula normal de ese tejido u órgano.

El término "promotor", tal como se usa en el presente documento, se define como una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción específica de una secuencia polinucleotídica.

5 Como se usa en el presente documento, el término "secuencia promotora/reguladora" significa una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto génico unido operativamente a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y, en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se requieren para
10 la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede ser, por ejemplo, una que exprese el producto génico de una manera específica de tejido.

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

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

20 Un promotor "específico de tejido" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está operativamente enlazada con un polinucleótido codificado o especificado por un gen, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo de tejido correspondiente a el promotor.

Por el término "se une específicamente", tal como se usa en el presente documento, se
25 entiende una molécula tal como un anticuerpo o CAR que reconoce un antígeno específico, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra o en un sujeto. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una especie también puede unirse a ese antígeno de una o más especies diferentes. Pero dicha reactividad entre especies no altera en sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En otro
30 ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno también puede unirse a diferentes formas alélicas del antígeno. Sin embargo, dicha reactividad cruzada no altera en sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En algunos casos, los términos "unión específica" o "se une específicamente" pueden usarse en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, para significar que la
35 interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante o epítipo antigénico) sobre la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a

una estructura de proteína específica en lugar de a proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre, sin marcar), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unida al anticuerpo.

5 El término "transfectado" o "transformado" o "transducido" como se usa en este documento se refiere a un proceso mediante el cual se transfiere o introduce ácido nucleico exógeno en la célula hospedera. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es una que ha sido transfectada, transformada o transducida con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula sujeto primaria y su progenie.

10 La frase "bajo control transcripcional" o "operativamente enlazado" como se usa en este documento significa que el promotor está en la ubicación y orientación correctas en relación con un polinucleótido para controlar el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa y la expresión del polinucleótido.

Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y
15 que puede usarse para administrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfifílicos, plásmidos y virus. Por lo tanto, el término "vector" incluye un plásmido o virus que se replica de forma autónoma. El término también debe interpretarse como incluyendo compuestos no plásmidos y no virales que
20 facilitan la transferencia de ácido nucleico a las células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares. Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales y similares.

Descripción

La presente invención proporciona composiciones y métodos para tratar el cáncer entre
25 otras enfermedades. El cáncer puede ser un tumor sólido, primario o metastatizante. En una modalidad, el cáncer es un cáncer que expresa CLDN6. En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, en particular adenocarcinoma de ovario y teratocarcinoma de ovario, cáncer de pulmón, que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), en particular de
30 carcinoma y adenocarcinoma de pulmón de células escamosas, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, en particular carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular sarcoma sinovial y carcinosarcoma, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga urinaria, en particular carcinoma de
35 células de transición y carcinoma papilar, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales que incluye carcinoma de células renales de células claras y carcinoma de células

renales papilares, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, incluyendo cáncer del íleon, en particular adenocarcinoma de intestino delgado y adenocarcinoma del íleon, carcinoma testicular embrionario, coriocarcinoma placentario, cáncer cervical, cáncer testicular, en particular seminoma testicular, teratoma testicular y cáncer testicular embrionario, cáncer
 5 uterino, tumores de células germinales tal como un teratocarcinoma o carcinoma embrionario, en particular tumores de células germinales de testículo, y formas metastásicas de los mismos. En una modalidad, la enfermedad cancerosa asociada con la expresión de CLDN6 se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de ovario metastásico y cáncer de pulmón metastásico. Preferiblemente, el cáncer de ovario es un
 10 carcinoma o un adenocarcinoma. Preferiblemente, el cáncer de pulmón es un carcinoma o un adenocarcinoma, y de preferencia es un cáncer bronquiolar tal como un carcinoma bronquiolar o un adenocarcinoma bronquiolar.

La presente invención proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio extracelular e intracelular. El dominio extracelular comprende un
 15 elemento de unión específico de objetivo denominado de otro modo un resto o dominio de unión a antígeno. El dominio intracelular o de otro modo el dominio citoplásmico comprende una región de señalización coestimuladora 4-1BB y una porción de cadena CD3-zeta. La región de señalización coestimuladora 4-1BB se refiere a una porción del CAR que comprende un dominio intracelular de la molécula coestimuladora 4-1BB. Las moléculas coestimuladoras son
 20 moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígenos o sus ligandos que se requieren para una respuesta eficaz de los linfocitos al antígeno.

Entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana del CAR, o entre el dominio citoplásmico y el dominio transmembrana del CAR, se puede incorporar un dominio o región
 25 separador. En modalidades, un dominio separador proporciona flexibilidad al dominio de unión a antígeno. Como se usa en este documento, el término "dominio separador" generalmente significa cualquier oligo o polipéptido que funciona para unir el dominio transmembrana al dominio extracelular o al dominio citoplásmico en la cadena polipeptídica. Un dominio separador puede comprender hasta 300 aminoácidos, preferiblemente de 10 a 100 aminoácidos y más preferiblemente de 25 a 50 aminoácidos. En modalidades, un dominio separador tiene
 30 alrededor de 10 a 300 aminoácidos, alrededor de 10 a 200 aminoácidos, alrededor de 10 a 175 aminoácidos, alrededor de 10 a 150 aminoácidos, alrededor de 10 a 125 aminoácidos, alrededor de 10 a 100 aminoácidos, alrededor de 10 a 75 aminoácidos, aproximadamente 10 a 50 aminoácidos, aproximadamente 10 a 40 aminoácidos, aproximadamente 10 a 30 aminoácidos, aproximadamente 10 a 20 aminoácidos o aproximadamente 10 a 15 aminoácidos, e incluyendo
 35 cualquier número entero entre los puntos finales de cualquiera de los rangos enumerados. En algunas modalidades, el dominio separador se deriva de una región de bisagra de una molécula

similar a inmunoglobulina. En modalidades, un dominio separador comprende toda o una porción de la región bisagra de una IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana o IgG4 humana, y puede contener una o más sustituciones de aminoácidos. En algunas modalidades, el dominio separador se deriva de la secuencia de la región bisagra de CD8 α .

5 En una modalidad, la invención proporciona una célula (por ejemplo, célula T) diseñada para expresar un CAR en la que la célula diseñada con CAR exhibe una propiedad antitumoral. El CAR de la invención, cuando se expresa en una célula, puede redirigir el reconocimiento de antígenos con base en la especificidad de unión al antígeno del CAR. En una modalidad, CLDN6 se expresa en células de los tipos de cáncer descritos en este documento. La célula
10 diseñada con CAR, cuando se une a su antígeno afín, afecta a una célula tumoral de modo que la célula tumoral no crece, se la induce a morir o se ve afectada de otro modo por lo que la carga tumoral en un paciente se reduce o se elimina.

De acuerdo con la invención, un resto de unión al antígeno CLDN6 se fusiona mediante un dominio de bisagra derivado de CD8 α con dominios intracelulares que comprenden una
15 combinación de un dominio de señalización 4-1BB (CD137) y un dominio de señalización CD3-zeta. La inclusión del dominio de señalización 4-1BB (CD137) aumenta significativamente la actividad antitumoral y la persistencia *in vivo* de las células T con CAR en comparación con una célula T con CAR por lo demás idéntica no diseñada para expresar 4-1BB (CD137) (Milone MC et al., (2009) Molecular Therapy 17 (8), 1453–1464).

20 **Resto de unión a antígeno**

El CAR de la invención comprende un elemento de unión específico de objetivo denominado de otro modo un resto de unión a antígeno o dominio de unión a antígeno que generalmente es parte del dominio extracelular de CAR. El dominio de unión al antígeno reconoce un ligando que actúa como marcador de la superficie celular en las células objetivo
25 asociadas con un estado patológico particular. Específicamente, el CAR de la invención se dirige al antígeno tumoral CLDN6 en una célula tumoral.

En una modalidad, el dominio de unión de CLDN6 en el CAR de la invención se une específicamente a CLDN6. En una modalidad, el CLDN6 al que se une el dominio de unión de CLDN6 en el CAR de la invención se expresa en una célula cancerosa. En una modalidad, el
30 CLDN6 se expresa en la superficie de una célula cancerosa. En una modalidad, el dominio de unión de CLDN6 se une a un dominio extracelular o a un epítipo en un dominio extracelular de CLDN6. En una modalidad, el dominio de unión de CLDN6 se une a epítipos nativos de CLDN6 presentes en la superficie de las células vivas. En una modalidad, el dominio de unión de CLDN6 se une al primer bucle extracelular de CLDN6, preferiblemente las posiciones de
35 aminoácidos 28 a 76 de CLDN6, o al segundo bucle extracelular de CLDN6, preferiblemente las posiciones de aminoácidos 141 a 159 de CLDN6. En modalidades particulares, el dominio de

unión de CLDN6 se une a un epítipo en CLDN6 que no está presente en CLDN9. Preferiblemente, el dominio de unión de CLDN6 se une a un epítipo en CLDN6 que no está presente en CLDN4 y/o CLDN3. Lo más preferiblemente, el dominio de unión de CLDN6 se une a un epítipo en CLDN6 que no está presente en una proteína CLDN distinta de CLDN6. El

5 dominio de unión de CLDN6 se une preferiblemente a CLDN6 pero no a CLDN9 y preferiblemente no se une a CLDN4 y/o CLDN3. Preferiblemente, el dominio de unión a CLDN6 es específico para CLDN6. Preferiblemente, el dominio de unión de CLDN6 se une a CLDN6 expresado en la superficie celular.

En una modalidad de la invención, un dominio de unión al antígeno CLDN6 comprende

10 una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH) con especificidad por CLDN6 y una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con especificidad por CLDN6. En una modalidad, dicha región variable de cadena pesada (VH) y la correspondiente región variable de cadena ligera (VL) están conectadas mediante un enlazador peptídico, preferiblemente un enlazador peptídico que comprende la secuencia de aminoácidos

15 (GGGGS)³.

En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3, 5, 7 y 9 o una variante funcional de la misma.

En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende una región variable de

20 cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 23 y 24 o una variante funcional de la misma.

En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende:

- (i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: x o una variante funcional de la misma, y
 - 25 (ii) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: x + 1 o una variante funcional de la misma;
- en donde x se selecciona de 3, 5, 7 y 9.

En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende:

- (i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de
- 30 aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3, 5, 7 y 9 o una variante funcional de la misma, y
- (ii) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 23 y 24 o una variante funcional de la misma.

35 En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende:

- (i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una variante funcional de la misma, y

(ii) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o una variante funcional de la misma.

En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende:

5 (i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una variante funcional de la misma, y

(ii) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 o una variante funcional de la misma.

En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende:

10 (i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una variante funcional de la misma, y

(ii) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 o una variante funcional de la misma.

En ciertas modalidades preferidas, un dominio de unión para CLDN6 comprende una combinación de región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena ligera (VL) seleccionada de las siguientes posibilidades (i) a (xi):

15 (i) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3 o una variante funcional de la misma, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos o variante funcional, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 o
20 una variante funcional de la misma, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos o variante funcional,

(ii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5 o una variante funcional de la misma, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos o variante funcional, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 6 o
25 una variante funcional de la misma, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos o variante funcional,

(iii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 7 o una variante funcional de la misma, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos o variante funcional, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8 o
30 una variante funcional de la misma, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos o variante funcional,

(iv) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 9 o una variante funcional de la misma, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos o variante funcional, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 10
35 o una variante funcional de la misma, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos o variante funcional,

(v) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5 o una variante funcional de la misma, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos o variante funcional, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 o una variante funcional de la misma, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos o variante funcional,

(vi) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5 o una variante funcional de la misma, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos o variante funcional, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 23 o una variante funcional de la misma, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos o variante funcional,

(vii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5 o una variante funcional de la misma, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos o variante funcional, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 24 o una variante funcional de la misma, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos o variante funcional.

En una modalidad particularmente preferida, un dominio de unión para CLDN6 comprende la siguiente combinación de región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena ligera (VL):

la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5 o una variante funcional de la misma, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos o variante funcional, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 24 o un variante de la misma, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos o variante funcional.

El término "fragmento" se refiere, en particular, a una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs), preferiblemente al menos la región variable CDR3, de la región variable de cadena pesada (VH) y/o de la región variable de cadena ligera (VL). En una modalidad, dichas una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) se seleccionan de un conjunto de regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3. En una modalidad particularmente preferida, el término "fragmento" se refiere a las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) y/o de la región variable de cadena ligera (VL).

En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 que comprende una o más CDR, un conjunto de CDRs o una combinación de conjuntos de CDRs como se describe en el presente documento comprende dichas CDRs junto con sus regiones marco intermedias. Preferiblemente, la porción también incluirá al menos aproximadamente el 50% de una o ambas de la primera y cuarta regiones de marco, en donde el 50% es el 50% C-terminal de la primera

región marco y el 50% N-terminal de la cuarta región de marco. La construcción de dominios de unión elaborados mediante técnicas de ADN recombinante puede resultar en la introducción de residuos N- o C-terminales en las regiones variables codificadas por enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otros pasos de manipulación, incluida la introducción de enlazadores para unir regiones variables o unir regiones variables a secuencias de proteínas adicionales que incluyen secuencias como se describe en el presente documento.

En una modalidad, un dominio de unión que comprende una o más CDRs, un conjunto de CDRs o una combinación de conjuntos de CDRs como se describe en el presente documento comprende dichas CDRs en un marco de anticuerpo humano.

En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente las tres secuencias de CDR de una región variable de cadena pesada (VH) descrita en este documento, por ejemplo, de una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3, 5, 7 y 9 o una variante funcional de la misma.

En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente las tres secuencias de CDR de una región variable de cadena ligera (VL) descrita en este documento, por ejemplo, de una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 23 y 24 o una variante funcional de la misma.

En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende:

(i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente las tres secuencias de CDR de una región variable de cadena pesada (VH) de una combinación de región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena ligera (VL) descrita en el presente documento, por ejemplo, una combinación en la que VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5 o una variante funcional de la misma, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 6 o una variante funcional de la misma, y

(ii) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente las tres secuencias de CDR de una región variable de cadena ligera (VL) de la combinación de región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena ligera (VL) descrita en el presente documento.

En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende:

(i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente las tres secuencias de CDR de una región variable

de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: x, o una variante funcional de la misma, y

(ii) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente las tres secuencias de CDR de una región variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: x + 1, o una variante funcional de la misma;

5 en donde x se selecciona de 3, 5, 7 y 9.

En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende:

(i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente las tres secuencias de CDR de una región variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 5, o una variante funcional de la misma, y

10 (ii) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente las tres secuencias de CDR de una región variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 6, o una variante funcional de la misma.

En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende:

(i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente las tres secuencias de CDR de una región variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 5, o una variante funcional de la misma, y

(ii) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente las tres secuencias de CDR de una región variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 4, o una variante funcional de la misma.

20 El término "al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente las tres secuencias de CDR" se refiere preferiblemente a por lo menos la secuencia de CDR3, opcionalmente en combinación con la secuencia de CDR1 y/o la secuencia de CDR2.

La CDR1 de una región variable de cadena pesada (VH) seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3, 5, 7 y 9 incluye preferiblemente los aminoácidos 26 a 33 de las secuencias mostradas en SEQ ID NOs: 3, 5, 7 y 9, respectivamente. La CDR2 de una región variable de cadena pesada (VH) seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 3, 5, 7 y 9 incluye preferiblemente los aminoácidos 51 a 58 de las secuencias mostradas en las SEQ ID NOs: 3, 5, 7 y 9, respectivamente. La CDR3 de una región variable de cadena pesada (VH) seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3, 5, 7 y 9 incluye preferiblemente los aminoácidos 97 a 106 de las secuencias mostradas en SEQ ID NOs: 3, 5, 7 y 9, respectivamente.

La CDR1 de una región variable de cadena ligera (VL) seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 23 y 24 incluye preferiblemente los aminoácidos 27 a 31 de las secuencias mostradas en SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 23 y 24, respectivamente. La CDR2 de una región variable de cadena ligera (VL) seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 23 y 24 incluye preferiblemente los aminoácidos 49 a 51 de las secuencias

mostradas en SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 23 y 24, respectivamente. La CDR3 de una región variable de cadena ligera (VL) seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 23 y 24 incluye preferiblemente los aminoácidos 88 a 97 de las secuencias mostradas en SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 23 y 24, respectivamente.

5 En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de CDR3 Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, en donde Xaa1 es cualquier aminoácido, preferiblemente un aminoácido aromático, más preferiblemente Phe o Tyr, lo más preferiblemente Tyr, Xaa2 es cualquier aminoácido, preferiblemente un aminoácido aromático, más preferiblemente Phe o Tyr, lo más preferiblemente Tyr, y Xaa3 es
 10 cualquier aminoácido, preferiblemente Leu o Phe, más preferiblemente Leu. En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de CDR3 Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 o Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, en donde Xaa1, Xaa2 y Xaa3 son como se definieron anteriormente. En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende una región variable de cadena pesada (VH) que
 15 comprende la secuencia de CDR3 Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, en la que Xaa1, Xaa2 y Xaa3 son como se definieron anteriormente. En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de CDR3 Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyr, en la que Xaa1, Xaa2 y Xaa3 son como se definieron anteriormente. En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 de acuerdo
 20 con las modalidades anteriores comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia CDR1 de acuerdo con SEQ ID NO: 16 o una variante funcional de la misma y/o la secuencia CDR2 de acuerdo con SEQ ID NO: 17 o una variante funcional de la misma.

En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende una región variable de
 25 cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de CDR3 Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro, en donde Xaa1 es cualquier aminoácido, preferiblemente Ser o Asn, lo más preferiblemente Ser, Xaa2 es cualquier aminoácido, preferiblemente Tyr, Ser, Ile, Asn o Thr, más preferiblemente Tyr, Ser o Asn, lo más preferiblemente Asn, y Xaa3 es cualquier aminoácido, preferiblemente Ser o Tyr, más preferiblemente Tyr. En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende una
 30 región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de CDR3 Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro, en la que Xaa1, Xaa2 y Xaa3 son como se definieron anteriormente. En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de CDR3 Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thr, en la que Xaa1, Xaa2 y Xaa3 son como se definieron anteriormente. En una modalidad, un dominio
 35 de unión para CLDN6 de acuerdo con las modalidades anteriores comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia CDR1 de acuerdo con SEQ ID NO:

21 o una variante funcional de la misma y/o la secuencia CDR2 de acuerdo con SEQ ID NO: 22 o una variante funcional de la misma.

En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 comprende:

(i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, y Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyr, en donde Xaa1 es cualquier aminoácido, preferiblemente un aminoácido aromático, más preferiblemente Phe o Tyr, lo más preferiblemente Tyr, Xaa2 es cualquier aminoácido, preferiblemente un aminoácido aromático, más preferiblemente Phe o Tyr, lo más preferiblemente Tyr, y Xaa3 es cualquier aminoácido, preferiblemente Leu o Phe, más preferiblemente Leu, y

(ii) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro, Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro, Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thr, en donde Xaa1 es cualquier aminoácido, preferiblemente Ser o Asn, lo más preferiblemente Ser, Xaa2 es cualquier aminoácido, preferiblemente Tyr, Ser, Ile, Asn o Thr, más preferiblemente Tyr, Ser o Asn, lo más preferiblemente Asn, y Xaa3 es cualquier aminoácido, preferiblemente Ser o Tyr, más preferiblemente Tyr.

En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 de acuerdo con las modalidades anteriores comprende (i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia CDR1 de acuerdo con SEQ ID NO: 16 o una variante funcional de la misma y/o la secuencia CDR2 de acuerdo con SEQ ID NO: 17 o una variante funcional de la misma y/o (ii) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia CDR1 de acuerdo con SEQ ID NO: 21 o una variante funcional de la misma y/o la secuencia CDR2 de acuerdo con SEQ ID NO: 22 o una variante funcional de la misma.

En una modalidad, un dominio de unión para CLDN6 compite por la unión de CLDN6 con un dominio de unión para CLDN6 descrito anteriormente y/o tiene la especificidad para CLDN6 de un dominio de unión para CLDN6 descrito anteriormente. En estas y otras modalidades, un dominio de unión para CLDN6 puede ser muy homólogo a un dominio de unión para CLDN6 descrito anteriormente. Se contempla que un dominio de unión preferido para CLDN6 tenga regiones de CDR idénticas o muy homólogas a las regiones CDR de un dominio de unión para CLDN6 descrito anteriormente. Por "altamente homólogo" se contempla que de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, tales como 1 a 3 o 1 o 2 sustituciones pueden hacerse en cada región CDR.

El término "competir" se refiere a la competencia entre dos moléculas de unión para unirse a un antígeno objetivo. Si dos moléculas de unión no se bloquean entre sí para unirse a

un antígeno objetivo, dichas moléculas de unión no compiten y esto es una indicación de que dichas moléculas de unión no se unen a la misma parte, es decir, al epítipo, del antígeno objetivo. Una persona experta en la técnica sabe bien cómo ensayar la competencia de moléculas de unión tales como anticuerpos para unirse a un antígeno objetivo. Un ejemplo de dicho método es el denominado ensayo de competencia cruzada, que puede, por ejemplo, llevarse a cabo como un ELISA o por citometría de flujo. Por ejemplo, se puede llevar a cabo un ensayo a base de ELISA recubriendo los pocillos de la placa ELISA con uno de los anticuerpos; añadir el anticuerpo competidor y el antígeno/objetivo marcado con His y detectar si el anticuerpo añadido inhibió la unión del antígeno marcado con His al anticuerpo recubierto, por ejemplo, añadiendo anticuerpo anti-His biotinilado, seguido de estreptavidina-poli-HRP, y desarrollando más la reacción con ABTS y midiendo la absorbancia a 405 nm. Por ejemplo, se puede llevar a cabo un ensayo de citometría de flujo incubando células que expresen el antígeno/objetivo con un exceso de anticuerpo no marcado, incubando las células con una concentración subóptima de anticuerpo marcado con biotina, seguido de incubación con estreptavidina marcada con fluorescencia y analizando por citometría de flujo.

Dos moléculas de unión tienen la "misma especificidad" si se unen al mismo antígeno y al mismo epítipo. Si una molécula que se va a probar reconoce el mismo epítipo como una determinada molécula de unión, es decir, las moléculas de unión se unen al mismo epítipo, se puede probar mediante diferentes métodos conocidos por el experto, por ejemplo, con base en la competencia de las moléculas de unión, tales como como anticuerpos para el mismo epítipo. La competencia entre las moléculas de unión se puede detectar mediante un ensayo de bloqueo cruzado. Por ejemplo, puede usarse un ensayo ELISA competitivo como ensayo de bloqueo cruzado. Por ejemplo, el antígeno objetivo puede recubrirse en los pocillos de una placa de microtitulación y puede añadirse el anticuerpo de unión a antígeno y el anticuerpo de prueba competidor candidato. La cantidad de anticuerpo de unión a antígeno unido al antígeno en el pocillo se correlaciona indirectamente con la capacidad de unión del anticuerpo de prueba competidor candidato que compite con el mismo por unirse al mismo epítipo. Específicamente, cuanto mayor es la afinidad del anticuerpo de prueba competidor candidato por el mismo epítipo, menor es la cantidad de anticuerpo de unión al antígeno unido al pocillo recubierto de antígeno. La cantidad de anticuerpo de unión a antígeno unido al pocillo puede medirse marcando el anticuerpo con sustancias de marcaje detectables o medibles.

Preferiblemente, la porción del resto de unión a antígeno en el CAR de la invención es scFV anti-CLDN6, en donde el scFV anti-CLDN6 comprende preferiblemente la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 35 o una variante funcional de la misma.

Dominio transmembrana

El CAR de la invención está diseñado para comprender un dominio transmembrana que

se fusiona con el dominio extracelular del CAR. En una modalidad, el dominio transmembrana no está asociado de forma natural con uno de los dominios del CAR. En una modalidad, el dominio transmembrana está asociado de forma natural con uno de los dominios del CAR. En una modalidad, el dominio transmembrana se modifica mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas proteínas de membrana de superficie o diferentes para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. El dominio transmembrana puede derivarse de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivarse de cualquier proteína transmembrana o unida a la membrana. Las regiones transmembrana de uso particular en esta invención pueden derivarse de (es decir, comprender al menos la región o regiones transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Como alternativa, el dominio transmembrana puede ser sintético, en cuyo caso comprenderá residuos predominantemente hidrófobos tales como leucina y valina. Preferiblemente, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético.

Preferiblemente, el dominio transmembrana en el CAR de la invención es el dominio transmembrana CD8 α . En una modalidad, el dominio transmembrana de CD8 α comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 o una variante funcional de la misma.

En algunos casos, el CAR de la invención comprende el dominio de bisagra CD8 α que forma el enlace entre el dominio transmembrana y el dominio extracelular. En una modalidad, el dominio de bisagra de CD8 α comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 o una variante funcional de la misma.

Dominio citoplasmático

El dominio citoplásmico o el dominio de señalización intracelular del CAR de la invención es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmune en la que se ha colocado el CAR. El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser actividad citolítica o actividad auxiliar, incluida la secreción de citocinas. Por tanto, el término "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula para que realice una función especializada. Aunque normalmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar la cadena completa. En la medida en que se use una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada se puede usar en lugar de la cadena intacta siempre que transduzca la señal de la función efectora. Por lo tanto, el término dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier parte truncada del

dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

Se sabe que las señales generadas a través del TCR solo son insuficientes para la 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 las células T está mediada por dos clases distintas de secuencia de señalización citoplasmática: las que inician la activación primaria dependiente del antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmática primaria) y las que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplásmicas secundarias).

El CAR de la invención comprende una secuencia de señalización citoplásmica primaria derivada de CD3-zeta. Además, el dominio citoplásmico del CAR de la invención está diseñado para comprender el dominio de señalización CD3-zeta combinado con una región de señalización coestimuladora derivada de 4-1BB.

El término "4-1BB" se refiere a una proteína receptora de membrana también denominada CD137, que es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) expresada en la superficie de las células T activadas como un tipo de molécula accesoria. 4-1BB tiene un peso molecular de 55 kDa y se encuentra como un homodímero.

La cadena de glicoproteína CD3-zeta de la superficie de las células T también conocida como cadena zeta de T3 del receptor de células T o CD247 es una proteína que en los seres humanos está codificada por el gen CD247. El receptor de células T zeta (ζ), junto con los heterodímeros alfa/beta y gamma/delta del receptor de células T y CD3-gamma, -delta y -épsilon, forman el complejo receptor de células T-CD3. La cadena zeta juega un papel importante en el acoplamiento del reconocimiento de antígenos a varias vías de transducción de señales intracelulares. La baja expresión del antígeno da como resultado una respuesta inmunitaria deteriorada.

Las secuencias de señalización citoplasmática dentro de la porción de señalización citoplásmica del CAR de la invención pueden unirse entre sí en un orden aleatorio o especificado. Opcionalmente, un enlazador oligo o polipéptido corto, preferiblemente de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace. Un doblete de glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado.

Por lo tanto, el dominio citoplásmico en el CAR de la invención está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. En una modalidad, el dominio citoplásmico en el CAR de la invención está diseñado para comprender el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en donde el dominio de señalización de 4-1BB comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 o una variante funcional de la misma y el dominio de señalización de CD3-zeta

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 o una variante funcional de la misma.

En una modalidad, el CAR de la invención comprende un péptido señal que dirige la proteína naciente al retículo endoplásmico. En una modalidad, el péptido señal precede al dominio de unión al antígeno. En una modalidad, el péptido señal se deriva de una inmunoglobulina tal como IgG. En una modalidad, el péptido señal comprende la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 25 o una variante funcional de la misma.

En una modalidad, un CAR de la invención comprende los siguientes elementos en el orden siguiente: NH₂ - dominio de unión al antígeno CLDN6 - dominio transmembrana - dominio coestimulador 4-1BB - dominio de señalización CD3-zeta - COOH.

En una modalidad, un CAR de la invención comprende los siguientes elementos en el orden siguiente: NH₂ - dominio de unión al antígeno CLDN6 - bisagra CD8 α - dominio transmembrana CD8 α - dominio coestimulador 4-1BB - dominio de señalización CD3-zeta - COOH.

En una modalidad, el CAR de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 o una variante funcional de la misma.

Vectores

La presente invención abarca una construcción de ácido nucleico tal como una construcción de ADN que comprende secuencias que codifican para un CAR de la invención.

La presente invención también proporciona vectores en los que se inserta un ADN de la presente invención. Los vectores derivados de retrovirus como el lentivirus son herramientas adecuadas para lograr la transferencia de genes a largo plazo, ya que permiten la integración estable a largo plazo de un transgén y su propagación en células hijas. Los vectores lentivirales tienen la ventaja añadida sobre los vectores derivados de onco-retrovirus como los virus de la leucemia murina en que pueden transducir células no proliferantes, tal como los hepatocitos. También tienen la ventaja añadida de una baja inmunogenicidad.

En resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican para CAR se logra típicamente uniéndolos operativamente a un ácido nucleico que codifica para el polipéptido CAR o partes del mismo a un promotor e incorporando la construcción en un vector de expresión. Los vectores pueden ser adecuados para la replicación e integración en eucariotas. Los vectores de clonación típicos contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada.

El ácido nucleico de la invención se puede clonar en varios tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede clonar en un vector que incluya, pero no se limite a, un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido o un transposón. Los

vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación. Además, se puede proporcionar un vector de expresión a una célula en forma de vector viral. La tecnología de vectores virales es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York) y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus que son útiles como vectores incluyen, pero no se limitan a, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios convenientes de endonucleasas de restricción y uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, WO 01/96584; WO 01/29058; y patente de EE.UU. No. 6,326,193).

Se han desarrollado varios sistemas a base de virus para la transferencia de genes a células de mamíferos. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de administración de genes. Un gen seleccionado puede insertarse en un vector y empaquetarse en partículas retrovirales usando técnicas conocidas en la técnica. A continuación, el virus recombinante puede aislarse y administrarse a las células del sujeto *in vivo* o *ex vivo*. Se conocen en la técnica varios sistemas retrovirales. En algunas modalidades, se usan vectores de adenovirus. Se conocen en la técnica varios vectores de adenovirus. En una modalidad, se usan vectores de lentivirus.

Elementos promotores adicionales, por ejemplo, potenciadores, regulan la frecuencia de inicio de la transcripción. Normalmente, estos se encuentran en la región 30-110 pb cadena arriba del sitio de inicio, aunque recientemente se ha demostrado que varios promotores contienen elementos funcionales también cadena abajo del sitio de inicio. La separación entre los elementos promotores es frecuentemente flexible, de modo que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven entre sí. En el promotor de timidina cinasa (tk), la separación entre los elementos del promotor se puede aumentar a 50 pb antes de que la actividad comience a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de forma cooperativa o independiente para activar la transcripción. Un ejemplo de un promotor adecuado es la secuencia promotora del citomegalovirus temprano inmediato (CMV). Esta secuencia promotora es una secuencia promotora constitutiva fuerte capaz de impulsar altos niveles de expresión de cualquier secuencia polinucleotídica unida operativamente a la misma. Otro ejemplo de un promotor adecuado es el factor de crecimiento de alargamiento-1 α (EF-1 α). Sin embargo, también se pueden usar otras secuencias promotoras constitutivas, que incluyen, entre otras, el promotor temprano del virus de simio 40 (SV40), el virus del tumor mamario de ratón (MMTV), el promotor de repetición terminal larga (LTR) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), promotor

MoMuLV, un promotor del virus de la leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos tales como, entre otros, el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina cinasa. Además, la invención no debe limitarse al uso de promotores constitutivos, también se contemplan promotores inducibles como parte de la invención. El uso de un promotor inducible proporciona un conmutador molecular capaz de activar la expresión de la secuencia de polinucleótidos a la que está operativamente enlazada cuando se desea dicha expresión, o desactivar la expresión cuando no se desea la expresión. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina.

Para evaluar la expresión de un polipéptido CAR o porciones del mismo, el vector de expresión que se va a introducir en una célula también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen indicador o ambos para facilitar la identificación y selección de células que expresan de la población de células que se busque sean transfectadas o infectadas a través de vectores virales. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede llevarse en una pieza separada de ADN y usarse en un procedimiento de cotransfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes indicadores pueden estar flanqueados por secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células hospederas. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tales como neo y similares.

Los genes indicadores se usan para identificar células potencialmente transfectadas y para evaluar la funcionalidad de secuencias reguladoras. En general, un gen indicador es un gen que no está presente ni es expresado por el organismo o tejido receptor y que codifica para un polipéptido cuya expresión se manifiesta por alguna propiedad fácilmente detectable, por ejemplo, actividad enzimática. La expresión del gen indicador se analiza en un momento adecuado después de que el ADN se haya introducido en las células receptoras. Los genes indicadores adecuados pueden incluir genes que codifican para luciferasa, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa, fosfatasa alcalina secretada o el gen de la proteína verde fluorescente. Los sistemas de expresión adecuados son bien conocidos y pueden prepararse usando técnicas conocidas u obtenerse comercialmente.

Se conocen en la técnica métodos para introducir y expresar genes en una célula. En el contexto de un vector de expresión, el vector se puede introducir fácilmente en una célula hospedera, por ejemplo, una célula de mamífero, bacteriana, de levadura o de insecto mediante cualquier método en la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión se puede transferir a una célula hospedera por medios físicos, químicos o biológicos.

Los métodos físicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedera incluyen precipitación con fosfato cálcico, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. Un método preferido para la introducción de un polinucleótido en una célula hospedera es la transfección con fosfato de calcio.

5 Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula hospedera incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales, y especialmente los vectores retrovirales, se han convertido en el método más ampliamente usado para insertar genes en células de mamíferos, por ejemplo, humanas. Otros vectores virales pueden derivarse de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adenoasociados y similares.

10 Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedera incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas a base de lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal ejemplar para usar como vehículo de administración *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial).

Células

Las células usadas en relación con el sistema CAR de la presente invención y en las que se pueden introducir ácidos nucleicos (ADN o ARN) que codifican para el sistema CAR de la presente invención incluyen cualquier célula con potencial lítico, en particular células linfoides, y son preferiblemente T células, en particular linfocitos citotóxicos, preferiblemente seleccionados entre células T citotóxicas, células asesinas naturales (NK) y células asesinas activadas por linfocinas (LAK). Tras la activación, cada uno de estos linfocitos citotóxicos desencadena la destrucción de las células objetivo. Por ejemplo, las células T citotóxicas desencadenan la destrucción de las células objetivo mediante uno o ambos de los siguientes medios. Primero, luego de la activación, las células T liberan citotoxinas como perforina, granzimas y granulisina. La perforina y la granulisina crean poros en la célula objetivo y las granzimas entran en la célula y desencadenan una cascada de caspasas en el citoplasma que induce la apoptosis (muerte celular programada) de la célula. En segundo lugar, la apoptosis se puede inducir mediante la interacción del ligando Fas-Fas entre las células T y las células objetivo. Los linfocitos citotóxicos serán preferiblemente células autólogas, aunque se pueden usar células heterólogas o células alogénicas.

Los términos "célula T" y "linfocito T" se usan indistintamente en este documento e incluyen células T auxiliares (células T CD4+) y células T citotóxicas (CTL, células T CD8+) que comprenden células T citolíticas. El término "célula T específica de antígeno" o términos similares se refieren a una célula T que reconoce el antígeno al que se dirige la célula T y preferiblemente ejerce funciones efectoras de las células T. Se considera que las células T son

específicas para el antígeno si las células matan a las células objetivo que expresan un antígeno. La especificidad de las células T puede evaluarse usando cualquiera de una variedad de técnicas estándar, por ejemplo, dentro de un ensayo de liberación de cromo o ensayo de proliferación. Como alternativa, se puede medir la síntesis de linfocinas (tal como interferón- γ).

5 Como se usa en este documento, el término "célula NK" o "célula asesina natural" se refiere a un subconjunto de linfocitos de sangre periférica definidos por la expresión de CD56 o CD16 y la ausencia del receptor de células T (CD3). Como se proporciona en el presente documento, la célula NK también se puede diferenciar de una célula madre o célula progenitora.

10 El término "funciones efectoras" en el contexto de la presente invención incluye cualquier función mediada por componentes del sistema inmunológico que resulten, por ejemplo, en la destrucción de células enfermas tales como células tumorales, o en la inhibición del crecimiento tumoral y/o inhibición del desarrollo de tumores, incluida la inhibición de la diseminación y metástasis tumorales. Preferiblemente, las funciones efectoras en el contexto de la presente invención son funciones efectoras mediadas por células T. Dichas funciones comprenden en el
15 caso de una célula T colaboradora (célula T CD4⁺) la liberación de citocinas y/o la activación de linfocitos CD8⁺ (CTLs) y/o células B, y en el caso de CTL la eliminación de células, es decir, células caracterizadas por la expresión de un antígeno, por ejemplo, mediante apoptosis o lisis celular mediada por perforina, producción de citocinas tales como IFN- γ y TNF- α , y destrucción citolítica específica de células objetivo que expresan antígeno.

20 El término "célula efectora inmunitaria" o "célula inmunorreactiva" en el contexto de la presente invención se refiere a una célula que ejerce funciones efectoras durante una reacción inmunitaria. Una "célula efectora inmunitaria" preferiblemente es capaz de unirse a un antígeno tal como un antígeno expresado en la superficie de una célula y mediar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, las células efectoras inmunitarias comprenden células T (células T
25 citotóxicas, células T auxiliares, células T que infiltran tumores), células B, células asesinas naturales, neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. Preferiblemente, en el contexto de la presente invención, "células efectoras inmunitarias" son células T, preferiblemente células T CD4⁺ y/o CD8⁺. De acuerdo con la invención, el término "célula efectora inmunitaria" también incluye una célula que puede madurar en una célula inmunitaria (tal como célula T, en particular
30 célula T colaboradora, o célula T citolítica) con una estimulación adecuada. Las células efectoras inmunitarias comprenden células madre hematopoyéticas CD34⁺, células T inmaduras y maduras y células B maduras e inmaduras. La diferenciación de los precursores de células T en células T citolíticas, cuando se exponen a un antígeno, es similar a la selección clonal del sistema inmunológico.

35 Preferiblemente, una "célula efectora inmunitaria" reconoce un antígeno con cierto grado de especificidad, en particular si está presente en la superficie de células enfermas tales como

células cancerosas. Preferiblemente, dicho reconocimiento permite que la célula que reconozca un antígeno sea sensible o reactiva. Si la célula es una célula T colaboradora (célula T CD4⁺), dicha capacidad de respuesta o reactividad puede implicar la liberación de citocinas y/o la activación de linfocitos CD8⁺ (CTLs) y/o células B. Si la célula es un CTL, dicha capacidad de respuesta o reactividad puede implicar la eliminación de células, es decir, células caracterizadas por la expresión de un antígeno, por ejemplo, mediante apoptosis o lisis celular mediada por perforina. De acuerdo con la invención, la capacidad de respuesta de CTL puede incluir flujo de calcio sostenido, división celular, producción de citocinas tales como IFN- γ y TNF- α , regulación positiva de marcadores de activación tales como CD44 y CD69, y destrucción citolítica específica de células objetivo que expresan antígenos. La capacidad de respuesta de CTL también se puede determinar usando un informador artificial que indique con precisión la capacidad de respuesta de CTL. Dichos CTL que reconocen un antígeno y son sensibles o reactivos también se denominan aquí "CTL sensibles a antígenos".

Una "célula linfoide" es una célula que, opcionalmente después de una modificación adecuada, por ejemplo, después de la transferencia de un CAR, es capaz de producir una respuesta inmune tal como una respuesta inmune celular, o una célula precursora de dicha célula, e incluye linfocitos, preferiblemente células T, linfoblastos y células plasmáticas. Una célula linfoide puede ser una célula efectora inmunitaria como se describe en el presente documento. Una célula linfoide preferida es una célula T que puede modificarse para expresar un CAR en la superficie celular. En una modalidad, la célula linfoide carece de expresión endógena de un receptor de células T.

Los términos "célula T" y "linfocito T" se usan indistintamente en este documento e incluyen células T auxiliares (células T CD4⁺) y células T citotóxicas (CTL, células T CD8⁺) que comprenden células T citolíticas.

Las células T pertenecen a un grupo de glóbulos blancos conocido como linfocitos y desempeñan un papel central en la inmunidad mediada por células. Se pueden distinguir de otros tipos de linfocitos, tal como las células B y las células asesinas naturales por la presencia de un receptor especial en su superficie celular llamado receptor de células T (TCR). El timo es el principal órgano responsable de la maduración de las células T. Se han descubierto varios subconjuntos diferentes de células T, cada uno con una función distinta.

Las células T auxiliares ayudan a otros glóbulos blancos en los procesos inmunológicos, incluida la maduración de las células B en células plasmáticas y la activación de células T citotóxicas y macrófagos, entre otras funciones. Estas células también se conocen como células T CD4⁺ porque expresan la proteína CD4 en su superficie. Las células T auxiliares se activan cuando se les presentan antígenos peptídicos mediante moléculas MHC de clase II que se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APCs). Una vez activados,

se dividen rápidamente y secretan pequeñas proteínas llamadas citocinas que regulan o ayudan en la respuesta inmune activa.

Las células T citotóxicas destruyen las células infectadas por virus y las células tumorales, y también están implicadas en el rechazo de trasplantes. Estas células también se conocen como células T CD8+ ya que expresan la glicoproteína CD8 en su superficie. Estas células reconocen sus objetivos al unirse al antígeno asociado con el MHC de clase I, que está presente en la superficie de casi todas las células del cuerpo.

La mayoría de las células T tienen un receptor de células T (TCR) que existe como un complejo de varias proteínas. El receptor de células T real está compuesto por dos cadenas de péptidos separadas, que se producen a partir de los genes alfa y beta del receptor de células T independientes (TCR α y TCR β) y se denominan cadenas α - y β -TCR. Las células T $\gamma\delta$ (células T gamma delta) representan un pequeño subconjunto de células T que poseen un receptor de células T (TCR) distinto en su superficie. Sin embargo, en las células T $\gamma\delta$, el TCR está formado por una cadena γ y una cadena δ . Este grupo de células T es mucho menos común (2% del total de células T) que las células T $\alpha\beta$.

Todas las células T se originan a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Los progenitores hematopoyéticos derivados de células madre hematopoyéticas pueblan el timo y se expanden por división celular para generar una gran población de timocitos inmaduros. Los primeros timocitos no expresan ni CD4 ni CD8 y, por lo tanto, se clasifican como células doble negativas (CD4-CD8-). A medida que avanzan en su desarrollo, se convierten en timocitos positivos dobles (CD4+CD8+) y finalmente maduran en timocitos positivos simples (CD4+CD8- o CD4-CD8+) que luego se liberan del timo a los tejidos periféricos.

Las células T generalmente se pueden preparar *in vitro* o *ex vivo*, usando procedimientos estándar. Por ejemplo, las células T pueden aislarse de la médula ósea, sangre periférica o una fracción de médula ósea o sangre periférica de un mamífero, tal como un paciente, usando un sistema de separación de células disponible comercialmente. Como alternativa, las células T pueden derivarse de seres humanos, animales no humanos, líneas celulares o cultivos relacionados o no relacionados. Una muestra que comprende células T puede ser, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Las células T que se usarán de acuerdo con la invención pueden expresar un receptor de células T endógeno o pueden carecer de la expresión de un receptor de células T endógeno.

El término "CAR dirigido a un antígeno" se refiere a un CAR que cuando está presente en una célula efectora inmunitaria, tal como una célula T, reconoce el antígeno, tal como en la superficie de las células presentadoras de antígeno o en las células enfermas, tal como las células cancerosas, de manera que el sistema inmunitario la célula efectora se estimula, ceba y/o expande o ejerce funciones efectoras de las células efectoras inmunitarias como se describió

anteriormente.

Fuentes de células T

Antes de la expansión y modificación genética de las células T de la invención, se obtiene una fuente de células T de un sujeto. Las células T pueden obtenerse de varias fuentes, incluidas células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de los ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. En determinadas modalidades de la presente invención, se puede usar cualquier número de líneas de células T disponibles en la técnica. En determinadas modalidades de la presente invención, las células T se pueden obtener a partir de una unidad de sangre extraída de un sujeto usando cualquier número de técnicas conocidas por el experto en la materia, tal como la separación Ficoll™. En una modalidad preferida, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen por aféresis. El producto de aféresis normalmente contiene linfocitos, incluidos células T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En una modalidad, las células recolectadas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un regulador de pH o medio apropiado para las etapas de procesamiento posteriores. En una modalidad de la invención, las células se lavan con solución salina de pH regulado con fosfato (PBS). En una modalidad alternativa, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no todos, cationes divalentes. Nuevamente, en forma sorprendente, los pasos de activación inicial en ausencia de calcio conducen a una activación magnificada. Como los expertos en la técnica apreciarán fácilmente, un paso de lavado se puede lograr mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tal como mediante el uso de una centrífuga de "flujo continuo" semiautomática (por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, Baxter CytoMate o Haemonetics Cell Saver 5) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células se pueden resuspender en una variedad de reguladores de pH biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS sin Ca^{2+} , sin Mg^{2+} , PlasmaLyte A u otra solución salina con o sin regulador de pH. Como alternativa, los componentes indeseables de la muestra de aféresis se pueden eliminar y las células se resuspenden directamente en el medio de cultivo.

En otra modalidad, las células T se aíslan de los linfocitos de sangre periférica lisando los glóbulos rojos y agotando los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™ o mediante elutriación centrífuga en contraflujo. Una subpoblación específica de células T, tal como las células T CD3^+ , CD28^+ , CD4^+ , CD8^+ , CD45RA^+ y CD45RO^+ , puede aislarse adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, en una modalidad, las células T se aíslan mediante incubación con perlas conjugadas anti- CD3 /anti- CD28 (es decir, 3x28), tal como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, durante un

período de tiempo suficiente para la selección positiva de las células T deseadas. En una modalidad, el período de tiempo varía de 30 minutos a 36 horas o más. El experto en la técnica reconocerá que también se pueden usar múltiples rondas de selección en el contexto de esta invención.

5 El enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa se puede lograr con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie exclusivos de las células seleccionadas negativamente. Un método es la clasificación y/o selección celular mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que usa un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células
10 seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4⁺ mediante selección negativa, un coctel de anticuerpos monoclonales normalmente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. En determinadas modalidades, puede ser deseable enriquecer o seleccionar positivamente células T reguladoras que típicamente expresan CD4⁺, CD25⁺, CD62Lhi, GITR⁺ y FoxP3⁺. Como alternativa, en determinadas
15 modalidades, las células T reguladoras se agotan mediante perlas conjugadas anti-CD25 u otro método de selección similar.

Puede usarse una variedad de métodos para introducir construcciones de CAR en células T, incluida la transfección de ADN no a base de virus, sistemas a base de transposones, sistemas a base de virus y sistemas a base de ARN. La transfección de ADN de base no viral
20 tiene un riesgo bajo de mutagénesis insercional. Los sistemas a base de transposones pueden integrar transgenes de manera más eficiente que los plásmidos que no contienen un elemento integrador. Los sistemas a base de virus incluyen el uso de γ -retrovirus y vectores lentivirales. Los γ -retrovirus son relativamente fáciles de producir, transducen de manera eficiente y permanente las células T, y se ha probado preliminarmente que son seguros desde el punto de
25 vista de la integración en las células T humanas primarias. Los vectores lentivirales también transducen las células T de forma eficaz y permanente, pero su fabricación es más cara. También son potencialmente más seguros que los sistemas a base de retrovirus.

En una modalidad de la invención, las células T o los progenitores de las células T se transfectan *ex vivo* o *in vivo* con un ácido nucleico que codifica para el CAR para proporcionar
30 células T genéticamente modificadas para expresar un CAR.

Las células T con CAR se pueden producir *in vivo* y, por lo tanto, casi instantáneamente, usando nanopartículas dirigidas a las células T. Por ejemplo, las nanopartículas basadas en poli(β -amino éster) pueden acoplarse a fragmentos anti-CD3e f(ab) para unirse a CD3 en las células T. Al unirse a las células T, estas nanopartículas se endocitosan. Su contenido, por
35 ejemplo, el ADN plasmídico que codifica para un antígeno CAR antitumoral, puede dirigirse al núcleo de la célula T debido a la inclusión de péptidos que contienen secuencias asociadas a

microtúbulos (MTAS) y señales de localización nuclear (NLSs). La inclusión de transposones con repeticiones invertidas (IRs) que flanquean el casete de expresión del gen CAR y un plásmido separado que codifica para una transposasa hiperactiva, puede permitir la integración eficiente del vector CAR en los cromosomas. Dicho sistema que permite la producción *in vivo* de células T con CAR después de la infusión de nanopartículas se describe en Smith et al. (2017) Nat. Nanotechnol. 12: 813-820.

Otra posibilidad es usar el método CRISPR/Cas9 para colocar deliberadamente una secuencia de codificación CAR en un locus específico. Por ejemplo, los receptores de células T (TCR) existentes pueden desactivarse, mientras que activan el CAR y lo colocan bajo el control regulador dinámico del promotor endógeno que, de otro modo, moderaría la expresión de TCR; c.f., por ejemplo, Eyquem et al. (2017) Nature 543: 113-117.

En una modalidad de todos los aspectos de la invención, las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR se transfectan de forma estable o transitoria con ácido nucleico que codifica para el CAR. Por lo tanto, el ácido nucleico que codifica para el CAR está integrado o no integrado en el genoma de las células T.

En una modalidad de todos los aspectos de la invención, las células T o los progenitores de células T proceden del sujeto que se va a tratar. En una modalidad de todos los aspectos de la invención, las células T o los progenitores de células T proceden de un sujeto que es diferente del sujeto que se va a tratar.

En una modalidad de todos los aspectos de la invención, las células T pueden ser autólogas, alogénicas o singénicas con respecto al sujeto que se va a tratar. Las células T pueden modificarse genéticamente *in vitro* para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR).

En una modalidad de todos los aspectos de la invención, las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR se inactivan para la expresión de un receptor de células T endógeno y/o HLA endógeno.

Activación y expansión de células T

Ya sea antes o después de la modificación genética de las células T para expresar un CAR deseable, las células T pueden activarse y expandirse generalmente usando métodos conocidos en la técnica.

Generalmente, las células T de la invención se expanden por contacto con una superficie que tiene unido un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células T. En particular, las poblaciones de células T pueden estimularse como se describe en este documento, tal como por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o por contacto con un activador de proteína

cinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de las células T, se usa un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de células T puede ponerse en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de las células T.

En determinadas modalidades, la señal estimuladora primaria y la señal coestimuladora para la célula T pueden proporcionarse mediante diferentes protocolos. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando se acoplan a una superficie, los agentes se pueden acoplar a la misma superficie (es decir, en formación "cis") o a superficies separadas (es decir, en formación "trans"). Como alternativa, un agente puede acoplarse a una superficie y el otro agente en solución. En una modalidad, el agente que proporciona la señal coestimuladora se une a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En determinadas modalidades, ambos agentes pueden estar en solución.

En una modalidad, los dos agentes se inmovilizan en perlas, ya sea en la misma perla, es decir, "cis", o en perlas separadas, es decir, "trans". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que proporciona la señal coestimuladora es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y ambos agentes se co-inmovilizan en la misma perla. En una modalidad, la proporción de anticuerpo CD3:CD28 unido a las perlas varía de 100:1 a 1:100.

Pueden usarse proporciones de partículas a células de 1:500 a 500:1 para estimular las células T u otras células objetivo. Como pueden apreciar fácilmente los expertos en la técnica, la relación de partículas a células puede depender del tamaño de partícula en relación con la célula objetivo. Por ejemplo, las perlas de tamaño pequeño solo podrían unir unas pocas células, mientras que las perlas más grandes podrían unir muchas. En determinadas modalidades, la relación de células a partículas varía de 1:100 a 100:1 y en otras modalidades la relación comprende de 1:9 a 9:1.

Las condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, Minimal Essential Media o RPMI Media 1640 o, X-vivo 15, (Lonza)) que pueden contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad, incluido suero (por ejemplo, suero fetal bovino o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β y TNF- α o cualesquiera otros aditivos para el crecimiento de células conocidos por el experto en la materia. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero no se limitan a, tensioactivo, plasmanato y agentes reductores tales como N-acetilcisteína y 2-mercaptoetanol. Las células objetivo se mantienen en las condiciones necesarias para soportar

el crecimiento, por ejemplo, una temperatura apropiada (por ejemplo, 37°C) y una atmósfera (por ejemplo, aire más 5% de CO₂).

Aplicación terapéutica

La presente invención abarca una célula (por ejemplo, célula T) que comprende una molécula de CAR de la invención, por ejemplo, transducida con un retroviral tal como un vector lentiviral (LV) que codifica para un CAR de la invención. Por tanto, en algunos casos, la célula T transducida puede provocar una respuesta de célula T mediada por CAR.

La invención proporciona el uso de un CAR para redirigir la especificidad de una célula T primaria al antígeno tumoral CLDN6. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para estimular una respuesta inmune mediada por células T a una población o tejido de células objetivo en un mamífero que comprende el paso de administrar al mamífero una célula T que expresa un CAR de la invención, en donde el CAR comprende un resto de unión que interactúa específicamente con CLDN6 como un objetivo predeterminado.

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 de la invención y la célula T con CAR se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida puede destruir las células tumorales del receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las células T con CAR pueden replicarse *in vivo*, lo que da como resultado una persistencia a largo plazo que puede conducir a un control tumoral sostenido.

En una modalidad, las células T con CAR de la invención pueden experimentar una expansión de células T *in vivo* robusta y pueden persistir durante un período de tiempo prolongado. En otra modalidad, las células T con CAR de la invención evolucionan a células T de memoria específicas que pueden reactivarse para inhibir cualquier formación o crecimiento tumoral adicional.

Los cánceres que pueden tratarse incluyen tumores que no están vascularizados, o que aún no están sustancialmente vascularizados, así como tumores vascularizados. Los cánceres pueden comprender tumores sólidos. Los tipos de cánceres que se van a tratar con los CAR de la invención incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, blastoma y sarcoma, y ciertas leucemias o neoplasias linfoides, tumores benignos y malignos y neoplasias, por ejemplo, sarcomas, carcinomas y melanomas. También se incluyen los tumores/cánceres de adultos y los tumores/cánceres pediátricos.

Los tumores sólidos son masas anormales de tejido que generalmente no contienen quistes ni áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. Los diferentes tipos de tumores sólidos reciben el nombre del tipo de células que los forman (tal como sarcomas, carcinomas y linfomas). Ejemplos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma

y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitomas carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, bicarcinoma de células renales, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de ductos biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga, melanoma y tumores del SNC (tal como glioma (tal como glioma del tronco encefálico y gliomas mixtos), glioblastoma (también conocido como glioblastoma multiforme) astrocitoma, linfoma del SNC, germinoma, meduloblastoma, Schwannoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, neuroblastoma, retinoblastoma y metástasis cerebrales).

En una modalidad, los cánceres que pueden tratarse son cánceres que expresan CLDN6 tales como los que se describen en el presente documento.

En una modalidad de la invención, las células se aíslan de un mamífero (preferiblemente un ser humano) y se modifican genéticamente (es decir, se transducen o transfectan *in vitro*) con un vector que expresa un CAR descrito en el presente documento. La célula modificada con CAR se puede administrar a un receptor mamífero para proporcionar un beneficio terapéutico. El receptor de mamífero puede ser un ser humano y la célula modificada con CAR puede ser autóloga con respecto al receptor. Como alternativa, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor.

Las células modificadas con CAR de la presente invención pueden administrarse solas o en combinación con otros componentes tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares. En una modalidad, las células modificadas con CAR de la presente invención se administran en combinación con una molécula de antígeno afín, o un ácido nucleico, en particular ARN, que codifica para una molécula de antígeno afín. La molécula de antígeno afín puede ser CLDN6, CLDN6 recombinante, un fragmento de CLDN6 o una variante de cualquiera de los anteriores. En una modalidad, se administra un ácido nucleico, en particular ARN, que codifica para la molécula de antígeno afín (por ejemplo, CLDN6, CLDN6 recombinante, un fragmento de CLDN6 o una variante de cualquiera de los anteriores). Preferiblemente, el ácido nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín se expresa en las células del sujeto al que se administran las células modificadas con CAR de la presente invención y el ácido nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín para proporcionar la molécula de antígeno afín para la unión por el dominio de unión a antígeno de CAR. En una modalidad, la expresión de la molécula de antígeno afín del dominio de unión a antígeno de CAR está en la superficie

celular. En una modalidad, el ácido nucleico que codifica para la molécula de antígeno afín se expresa de forma transitoria en las células del sujeto. En una modalidad, la codificación nucleica de la molécula de antígeno afín es ARN. Preferiblemente, poner en contacto las células modificadas con CAR de la presente invención con la molécula de antígeno afín da como resultado la expansión y/o activación de las células.

Los antígenos de péptidos y proteínas adecuados para su uso de acuerdo con la invención incluyen típicamente un péptido o proteína que comprende un epítipo al que se une el dominio de unión al antígeno CLDN6 del CAR de la invención. El péptido o proteína o epítipo puede derivarse de CLDN6. Por ejemplo, el antígeno peptídico o proteico o el epítipo contenido dentro del antígeno peptídico o proteico puede ser CLDN6 o un fragmento o variante de CLDN6.

Un antígeno de péptido y proteína proporcionado a un sujeto de acuerdo con la invención (ya sea mediante la administración del antígeno de péptido y proteína o un ácido nucleico, en particular ARN, que codifica para el antígeno de péptido y proteína), es decir, un antígeno de vacuna, preferiblemente resulta en estimulación, cebado y/o expansión de células modificadas con CAR en el sujeto al que se administran las células modificadas con CAR y el antígeno o ácido nucleico. Dichas células modificadas con CAR estimuladas, cebadas y/o expandidas se dirigen preferiblemente contra el antígeno objetivo CLDN6, en particular el antígeno objetivo expresado por células, tejidos y/u órganos enfermos, es decir, el antígeno asociado a la enfermedad. Por lo tanto, un antígeno de vacuna puede comprender el antígeno asociado a la enfermedad, o un fragmento o variante del mismo. En una modalidad, tal fragmento o variante es inmunológicamente equivalente al antígeno asociado a la enfermedad. En el contexto de la presente invención, el término "fragmento de un antígeno" o "variante de un antígeno" significa un agente que da como resultado la estimulación, cebado y/o expansión de células modificadas con CAR cuyas células modificadas con estimuladas, cebadas y/o expandidas se dirigen al antígeno asociado a la enfermedad, en particular cuando se expresan en la superficie de células, tejidos y/u órganos enfermos. Por lo tanto, el antígeno de vacuna administrado de acuerdo con la invención puede corresponder o comprender el antígeno asociado a la enfermedad, puede corresponder o puede comprender un fragmento del antígeno asociado a la enfermedad o puede corresponder o puede comprender un antígeno que sea homólogo al antígeno asociado a la enfermedad o un fragmento del mismo. Si el antígeno de la vacuna administrado de acuerdo con la invención comprende un fragmento del antígeno asociado a la enfermedad o una secuencia de aminoácidos que es homóloga a un fragmento del antígeno asociado a la enfermedad, dicho fragmento o secuencia de aminoácidos puede comprender un epítipo del antígeno asociado a la enfermedad o una secuencia que sea homóloga a un epítipo del antígeno asociado a la enfermedad, en donde las células modificadas con CAR se unan a dicho epítipo. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, un

antígeno puede comprender un fragmento inmunogénico del antígeno asociado a la enfermedad o una secuencia de aminoácidos que sea homóloga a un fragmento inmunogénico del antígeno asociado a la enfermedad. Un "fragmento inmunogénico de un antígeno" de acuerdo con la invención se refiere preferiblemente a un fragmento de un antígeno que es capaz de estimular, 5 cebar y/o expandir células modificadas con CAR. Se prefiere que el antígeno de la vacuna (similar al antígeno asociado a la enfermedad) proporcione el epítipo relevante para la unión por el dominio de unión al antígeno CLDN6 presente en el CAR de las células modificadas con CAR. También se prefiere que el antígeno de la vacuna (similar al antígeno asociado a la enfermedad) se exprese en la superficie de una célula tal como una célula presentadora de 10 antígeno para proporcionar el epítipo relevante para la unión por el CAR. El antígeno de vacuna de acuerdo con la invención puede ser un antígeno recombinante.

El término "inmunológicamente equivalente" significa que la molécula inmunológicamente equivalente tal como la secuencia de aminoácidos inmunológicamente equivalente exhibe las mismas o esencialmente las mismas propiedades inmunológicas y/o 15 ejerce los mismos o esencialmente los mismos efectos inmunológicos, por ejemplo, con respecto al tipo de el efecto inmunológico. En el contexto de la presente invención, el término "inmunológicamente equivalente" se usa preferiblemente con respecto a los efectos o propiedades inmunológicos de los antígenos o variantes de antígenos. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos es inmunológicamente equivalente a una secuencia de aminoácidos 20 de referencia, por ejemplo, CLDN6, si dicha secuencia de aminoácidos cuando se expone a células modificadas con CAR que se unen a la secuencia de aminoácidos de referencia o células que expresan la secuencia de aminoácidos de referencia induce un reacción inmune que tiene la especificidad de reaccionar con la secuencia de aminoácidos de referencia, en particular estimulación, cebado y/o expansión de células modificadas con CAR. Así, una molécula que 25 es inmunológicamente equivalente a un antígeno exhibe las mismas o esencialmente las mismas propiedades y/o ejerce los mismos o esencialmente los mismos efectos con respecto a la estimulación, cebado y/o expansión de células modificadas con CAR que el antígeno al que son dirigidas las células modificadas con CAR.

"Activación" o "estimulación", tal como se usa en este documento, se refiere al estado 30 de una célula T que ha sido suficientemente estimulada para inducir la proliferación celular detectable. La activación también puede estar asociada con la producción de citocinas inducida y funciones efectoras detectables. El término "células T activadas" se refiere, entre otras cosas, a células T que están experimentando división celular.

El término "cebado" se refiere a un proceso en donde una célula T tiene su primer 35 contacto con su antígeno específico y provoca la diferenciación en células T efectoras.

El término "expansión clonal" o "expansión" se refiere a un proceso en donde se

multiplica una entidad específica. En el contexto de la presente invención, el término se usa preferiblemente en el contexto de una respuesta inmunológica en la que los linfocitos son estimulados por un antígeno, proliferan y se amplifica el linfocito específico que reconoce dicho antígeno. Preferiblemente, la expansión clonal conduce a la diferenciación de los linfocitos.

5 Se prefiere particularmente de acuerdo con la invención que el antígeno afín se administre en forma de ARN que codifica para el antígeno. Después de la administración del ARN, al menos una porción del ARN se administra a una célula objetivo. En una modalidad, al menos una porción del ARN se administra al citosol de la célula objetivo. En una modalidad, la célula objetivo traduce el ARN para producir el péptido o la proteína codificados. Algunas
10 modalidades implican la administración dirigida del ARN a ciertos tejidos. En una modalidad, el suministro implica dirigirse al sistema linfático, en particular a órganos linfoides secundarios, más específicamente al bazo. En una modalidad, la célula objetivo es una célula del bazo. En una modalidad, la célula objetivo es una célula presentadora de antígeno tal como una célula presentadora de antígeno profesional en el bazo. En una modalidad, la célula objetivo es una
15 célula dendrítica en el bazo.

El "sistema linfático" es parte del sistema circulatorio y una parte importante del sistema inmunológico, que comprende una red de vasos linfáticos que transportan la linfa. El sistema linfático consiste en órganos linfáticos, una red conductora de vasos linfáticos y la linfa circulante. Los órganos linfoides primarios o centrales generan linfocitos a partir de células
20 progenitoras inmaduras. El timo y la médula ósea constituyen los órganos linfoides primarios. Los órganos linfoides secundarios o periféricos, que incluyen los ganglios linfáticos y el bazo, mantienen los linfocitos maduros vírgenes e inician una respuesta inmunitaria adaptativa.

El ARN puede administrarse al bazo mediante las denominadas formulaciones lipoplejas, en las que el ARN se une a liposomas que comprenden un lípido catiónico y,
25 opcionalmente, un lípido adicional o auxiliar para formar formulaciones de nanopartículas inyectables. Los liposomas se pueden obtener inyectando una solución de los lípidos en etanol en agua o en una fase acuosa adecuada. Las partículas de lipoplejo de ARN se pueden preparar mezclando los liposomas con ARN. Las partículas de lipoplejo de ARN que se dirigen al bazo se describen en el documento WO 2013/143683, incorporado aquí como referencia. Se
30 ha descubierto que las partículas de lipoplejo de ARN que tienen una carga neta negativa pueden usarse para dirigirse preferentemente al tejido del bazo o a las células del bazo, tal como las células presentadoras de antígenos, en particular las células dendríticas. En consecuencia, después de la administración de las partículas de lipoplejo de ARN, se produce la acumulación de ARN y/o la expresión de ARN en el bazo. Por lo tanto, las partículas de
35 lipoplejo de ARN de la invención pueden usarse para expresar ARN en el bazo. En una modalidad, después de la administración de las partículas de lipoplejo de ARN, no se produce

acumulación de ARN y/o expresión de ARN en el pulmón y/o el hígado o esencialmente no se produce. En una modalidad, después de la administración de las partículas de lipoplejo de ARN, se produce acumulación de ARN y/o expresión de ARN en células presentadoras de antígeno, tales como células presentadoras de antígeno profesionales en el bazo. Por tanto, las partículas de lipoplejo de ARN de la invención pueden usarse para expresar ARN en tales células presentadoras de antígenos. En una modalidad, las células presentadoras de antígeno son células dendríticas y/o macrófagos.

En el contexto de la presente invención, el término "partícula de lipoplejo de ARN" se refiere a una partícula que contiene lípidos, en particular lípidos catiónicos, y ARN. Las interacciones electrostáticas entre liposomas cargados positivamente y ARN cargado negativamente dan como resultado la complejación y la formación espontánea de partículas de lipoplejo de ARN. Los liposomas cargados positivamente se pueden sintetizar generalmente usando un lípido catiónico, tal como DOTMA, y lípidos adicionales, tal como DOPE. En una modalidad, una partícula de lipoplejo de ARN es una nanopartícula.

Como se usa en este documento, un "lípido catiónico" se refiere a un lípido que tiene una carga neta positiva. Los lípidos catiónicos se unen al ARN cargado negativamente mediante interacción electrostática a la matriz lipídica. Generalmente, los lípidos catiónicos poseen un resto lipófilo, tal como un esteroil, una cadena de acilo o diacilo, y el grupo de cabeza del lípido típicamente lleva la carga positiva. Los ejemplos de lípidos catiónicos incluyen, pero no se limitan a, 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA), dimetildioctadecilamonio (DDAB); 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio propano (DOTAP); 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP); propanos de 1,2-diaciloxi-3-dimetilamonio; propanos de 1,2-dialquiloil-3-dimetilamonio; cloruro de dioctadecildimetil amonio (DODAC), 2,3-di(tetradecoxi)propil-(2-hidroxietil)-dimetilazanio (DMRIE), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DMEPC), 1,2-dimiristoil-3-trimetilamonio propano (DMTAP), bromuro de 1,2-dioleoiloxipropil-3-dimetil-hidroxietil amonio (DORIE) y trifluoroacetato de 2,3-dioleoiloxi-N-[2(espermina carboxamida)etil]-N,N-dimetil-1-propanamio (DOSPA). Se prefieren DOTMA, DOTAP, DODAC y DOSPA. En modalidades específicas, el lípido catiónico es DOTMA y/o DOTAP.

Puede incorporarse un lípido adicional para ajustar la relación de carga global positiva a negativa y la estabilidad física de las partículas de lipoplejo de ARN. En determinadas modalidades, el lípido adicional es un lípido neutro. Como se usa en este documento, un "lípido neutro" se refiere a un lípido que tiene una carga neta de cero. Los ejemplos de lípidos neutros incluyen, entre otros, 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidil etanol amina, ceramida, esfingoemielina, cefalina, colesterol y cerebrósido. En modalidades específicas, el

lípidos adicionales es DOPE, colesterol y/o DOPC.

En determinadas modalidades, las partículas de lipoplejo de ARN incluyen tanto un lípido catiónico como un lípido adicional. En una modalidad ejemplar, el lípido catiónico es DOTMA y el lípido adicional es DOPE.

5 En algunas modalidades, la relación molar del por lo menos un lípido catiónico al por lo menos un lípido adicional es de aproximadamente 10:0 a aproximadamente 1:9, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2, o de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:1. En modalidades específicas, la relación molar puede ser aproximadamente 3:1, aproximadamente 2.75:1, aproximadamente 2.5:1, aproximadamente 2.25:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 1.75:1, aproximadamente 1.5:1, aproximadamente 1.25:1 o aproximadamente 1:1. En una modalidad ejemplar, la relación molar del por lo menos un lípido catiónico al por lo menos un lípido adicional es de aproximadamente 2:1.

Las partículas de lipoplejo de ARN descritas en este documento tienen un diámetro promedio que en una modalidad varía de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 1000 nm, de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 250 a aproximadamente 700 nm, de aproximadamente 400 a aproximadamente 600 nm, de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 500 nm, o desde aproximadamente 350 nm a aproximadamente 400 nm. En modalidades específicas, las partículas de lipoplejo de ARN tienen un diámetro promedio de aproximadamente 200 nm, aproximadamente 225 nm, aproximadamente 250 nm, aproximadamente 275 nm, aproximadamente 300 nm, aproximadamente 325 nm, aproximadamente 350 nm, aproximadamente 375 nm, aproximadamente 400 nm, aproximadamente 425 nm, aproximadamente 450 nm, aproximadamente 475 nm, aproximadamente 500 nm, aproximadamente 525 nm, aproximadamente 550 nm, aproximadamente 575 nm, aproximadamente 600 nm, aproximadamente 625 nm, aproximadamente 650 nm, aproximadamente 700 nm, aproximadamente 725 nm, aproximadamente 750 nm, aproximadamente 775 nm, aproximadamente 800 nm, aproximadamente 825 nm, aproximadamente 850 nm, aproximadamente 875 nm, aproximadamente 900 nm, aproximadamente 925 nm, aproximadamente 950 nm, aproximadamente 975 nm o aproximadamente 1000 nm. En una modalidad, las partículas de lipoplejo de ARN tienen un diámetro promedio que varía de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 700 nm. En otra modalidad, las partículas de lipoplejo de ARN tienen un diámetro promedio que varía de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 500 nm. En una modalidad ejemplar, las partículas de lipoplejo de ARN tienen un diámetro promedio de aproximadamente 400 nm.

35 La carga eléctrica de las partículas de lipoplejo de ARN de la presente invención es la suma de las cargas eléctricas presentes en el al menos un lípido catiónico y las cargas eléctricas

presentes en el ARN. La relación de carga es la relación entre las cargas positivas presentes en el al menos un lípido catiónico y las cargas negativas presentes en el ARN. La relación de carga de las cargas positivas presentes en el al menos un lípido catiónico a las cargas negativas presentes en el ARN se calcula mediante la siguiente ecuación: relación de carga =

5 [(concentración de lípidos catiónicos (mol)) * (el número total de cargas positivas en el lípido catiónico)] / [(concentración de ARN (mol)) * (el número total de cargas negativas en el ARN)].

Las partículas de lipolejo de ARN que se dirigen al bazo descritas en el presente documento a pH fisiológico tienen preferiblemente una carga negativa neta tal como una relación de carga de cargas positivas a cargas negativas de aproximadamente 1.9:2 a

10 aproximadamente 1:2. En modalidades específicas, la relación de carga de cargas positivas a cargas negativas en las partículas de lipolejo de ARN a pH fisiológico es aproximadamente 1.9:2.0, aproximadamente 1.8:2.0, aproximadamente 1.7:2.0, aproximadamente 1.6:2.0, aproximadamente 1.5:2.0, aproximadamente 1.4:2.0, aproximadamente 1.3:2.0, aproximadamente 1.2:2.0, aproximadamente 1.1:2.0 o aproximadamente 1:2.0.

15 Las células modificadas con CAR y los agentes adicionales descritos en el presente documento pueden administrarse en composiciones farmacéuticas o medicamentos para tratamientos terapéuticos o profilácticos y pueden administrarse en forma de cualquier composición farmacéutica adecuada.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una formulación que comprende un

20 agente terapéuticamente eficaz, preferiblemente junto con vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Dicha composición farmacéutica es útil para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad o trastorno mediante la administración de dicha composición farmacéutica a un sujeto. Una composición farmacéutica también se conoce en la técnica como formulación farmacéutica.

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender uno o más adyuvantes o pueden administrarse con uno o más adyuvantes. El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que prolonga, potencia o acelera una respuesta inmune. Los adyuvantes comprenden un grupo heterogéneo de compuestos como emulsiones oleosas (por ejemplo, adyuvantes de Freund), compuestos minerales (tal como alumbre), productos bacterianos (tal como la toxina de *Bordetella pertussis*) o complejos inmunoestimulantes. Los

30 ejemplos de adyuvantes incluyen, sin limitación, LPS, GP96, oligodesoxinucleótidos CpG, factores de crecimiento y citocinas, tales como monocinas, linfocinas, interleucinas, quimiocinas. Las quimiocinas pueden ser IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL12, IFN α , IFN γ , GM-CSF, LT- α . Otros adyuvantes conocidos son hidróxido de aluminio, adyuvante

35 de Freund o aceite tal como Montanide® ISA51. Otros adyuvantes adecuados para usar en la presente invención incluyen lipopéptidos, tales como Pam3Cys.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se aplican generalmente en una "cantidad farmacéuticamente eficaz" y en "una preparación farmacéuticamente aceptable".

5 El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a la no toxicidad de un material que no interactúa con la acción del componente activo de la composición farmacéutica.

El término "cantidad farmacéuticamente eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad que consigue una reacción deseada o un efecto deseado solo o junto con dosis adicionales. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular, la reacción deseada se refiere preferiblemente a la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende ralentizar el progreso de la enfermedad y, en particular, interrumpir o revertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad también puede ser un retraso del inicio o una prevención del inicio de dicha enfermedad o dicha condición. Una cantidad eficaz de las composiciones descritas en este documento dependerá de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, incluida la edad, la afección fisiológica, el tamaño y el peso, la duración del tratamiento, el tipo de terapia acompañante (si está presente), la vía específica de administración y factores similares. En consecuencia, las dosis administradas de las composiciones descritas en este documento pueden depender de varios de dichos parámetros. En el caso de que una reacción en un paciente sea insuficiente con una dosis inicial, se pueden usar dosis más altas (o dosis efectivamente más altas logradas por una vía de administración diferente, más localizada).

10
15
20

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener sales, reguladores de pH, conservadores y opcionalmente otros agentes terapéuticos. En una modalidad, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden uno o más portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

25 Los conservadores adecuados para usar en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, sin limitación, cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabeno y timerosal.

El término "excipiente" como se usa en este documento se refiere a una sustancia que puede estar presente en una composición farmacéutica de la presente invención pero que no es un ingrediente activo. Los ejemplos de excipientes incluyen, sin limitación, portadores, aglutinantes, diluyentes, lubricantes, espesantes, agentes tensioactivos, conservadores, estabilizadores, emulsionantes, reguladores de pH, agentes saborizantes o colorantes.

30

El término "diluyente" se refiere a un agente diluyente y/o adelgazador. Además, el término "diluyente" incluye uno cualquiera o más de suspensiones y/o medios de mezcla fluidos, líquidos o sólidos. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua.

35

El término "portador" se refiere a un componente que puede ser natural, sintético,

orgánico, inorgánico en donde el componente activo se combina para facilitar, mejorar o permitir la administración de la composición farmacéutica. Un portador como se usa en este documento puede ser una o más cargas, diluyentes o sustancias encapsulantes sólidos o líquidos compatibles, que son adecuados para la administración al sujeto. Los portadores adecuados incluyen, sin limitación, agua estéril, Ringer, lactato de Ringer, solución estéril de cloruro de sodio, solución salina isotónica, polialquilenglicoles, naftalenos hidrogenados y, en particular, polímeros de lacturo biocompatibles, copolímeros de lacturo/glicólido o copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno. En una modalidad, la composición farmacéutica de la presente invención incluye solución salina isotónica.

Los portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R Gennaro edit. 1985).

Los portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticos pueden seleccionarse con respecto a la vía de administración pretendida y la práctica farmacéutica estándar.

En una modalidad, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden administrar por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica o intramuscular. En determinadas modalidades, la composición farmacéutica se formula para la administración local o sistémica. La administración sistémica puede incluir la administración enteral, que implica la absorción a través del tracto gastrointestinal, o la administración parenteral. Como se usa en este documento, "administración parenteral" se refiere a la administración de cualquier otra manera que no sea a través del tracto gastrointestinal, tal como por inyección intravenosa. En una modalidad preferida, las composiciones farmacéuticas se formulan para administración sistémica. En otra modalidad preferida, la administración sistémica es por administración intravenosa. Las composiciones se pueden inyectar directamente en un tumor o ganglio linfático.

El término "coadministración", tal como se usa en el presente documento, significa un proceso mediante el cual se administran diferentes compuestos o composiciones al mismo paciente. Por ejemplo, las células modificadas con CAR y el antígeno o ácido nucleico que las codifica para descritos en el presente documento pueden administrarse simultáneamente, esencialmente al mismo tiempo o secuencialmente. Si la administración tiene lugar secuencialmente, las células modificadas con CAR pueden administrarse antes o después de la administración del antígeno o ácido nucleico que las codifica. Si la administración tiene lugar simultáneamente, las células modificadas con CAR y el antígeno o ácido nucleico que las codifica para no necesitan administrarse dentro de la misma composición. Las células modificadas con CAR y el antígeno o ácido nucleico que las codifica para pueden administrarse una o más veces y el número de administraciones de cada componente puede ser el mismo o

diferente. Además, las células modificadas con CAR y el antígeno o ácido nucleico que las codifica para no necesitan administrarse en el mismo sitio.

El término "enfermedad" se refiere a una condición anormal que afecta el cuerpo de un individuo. Una enfermedad se suele interpretar como una afección médica asociada con signos y síntomas específicos. Una enfermedad puede ser causada por factores originalmente de una fuente externa, tal como una enfermedad infecciosa, o puede ser causada por disfunciones internas, tal como enfermedades autoinmunes. En los seres humanos, "enfermedad" se usa a menudo de manera más amplia para referirse a cualquier condición que cause dolor, disfunción, angustia, problemas sociales o la muerte del individuo afectado, o problemas similares para quienes están en contacto con el individuo. En este sentido más amplio, a veces incluye lesiones, discapacidades, trastornos, síndromes, infecciones, síntomas aislados, conductas desviadas y variaciones atípicas de estructura y función, mientras que en otros contextos y para otros fines pueden considerarse categorías distinguibles. Las enfermedades generalmente afectan a las personas no solo físicamente, sino también emocionalmente, ya que contraer y vivir con muchas enfermedades puede alterar la perspectiva de la vida y la personalidad de uno.

En el presente contexto, el término "tratamiento", "tratar" o "intervención terapéutica" se refiere al manejo y cuidado de un sujeto con el propósito de combatir una condición tal como una enfermedad o trastorno. El término está destinado a incluir el espectro completo de tratamientos para una afección determinada que padece el sujeto, tal como la administración del compuesto terapéuticamente eficaz para aliviar los síntomas o complicaciones, para retrasar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección, para aliviar o aliviar los síntomas y complicaciones, y/o curar o eliminar la enfermedad, trastorno o afección, así como prevenir la afección, en donde la prevención debe entenderse como el manejo y cuidado de un individuo con el propósito de combatir la enfermedad, condición o trastorno e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir la aparición de los síntomas o complicaciones.

El término "tratamiento terapéutico" se refiere a cualquier tratamiento que mejora el estado de salud y/o prolonga (aumenta) la vida útil de un individuo. Dicho tratamiento puede eliminar la enfermedad en un individuo, detener o retardar el desarrollo de una enfermedad en un individuo, inhibir o retardar el desarrollo de una enfermedad en un individuo, disminuir la frecuencia o severidad de los síntomas en un individuo y/o disminuir la recurrencia en un individuo que actualmente tiene o que previamente ha tenido una enfermedad.

Los términos "tratamiento profiláctico" o "tratamiento preventivo" se refieren a cualquier tratamiento destinado a prevenir la aparición de una enfermedad en un individuo. Los términos "tratamiento profiláctico" o "tratamiento preventivo" se usan aquí de forma intercambiable.

Los términos "individuo" y "sujeto" se usan aquí de manera intercambiable. Se refieren a un ser humano u otro mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, gato, ganado, cerdo,

oveja, caballo o primate) que puede estar afectado o ser susceptible a una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) pero que puede o puede que no tenga la enfermedad o el trastorno. En muchas modalidades, el individuo es un ser humano. A menos que se indique lo contrario, los términos "individuo" y "sujeto" no denotan una edad en particular y, por lo tanto, abarcan a adultos, ancianos, niños y recién nacidos. En modalidades de la presente invención, el "individuo" o "sujeto" es un "paciente".

El término "paciente" significa un individuo o sujeto para tratamiento, en particular un individuo o sujeto enfermo.

Las estrategias de combinación en el tratamiento del cáncer pueden ser deseables debido al efecto sinérgico resultante, que puede ser considerablemente más fuerte que el impacto de un enfoque monoterapéutico. En una modalidad, la composición farmacéutica se administra con un agente inmunoterapéutico. Como se usa en este documento, "agente inmunoterapéutico" se refiere a cualquier agente que pueda estar involucrado en la activación de una respuesta inmune específica y/o función (es) efectora (s) inmune (s). La presente invención contempla el uso de un anticuerpo como agente inmunoterapéutico. Sin desear limitarse a ninguna teoría, los anticuerpos son capaces de lograr un efecto terapéutico contra las células cancerosas a través de varios mecanismos, que incluyen la inducción de apoptosis, el bloqueo de componentes de las vías de transducción de señales o la inhibición de la proliferación de células tumorales. En determinadas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo monoclonal puede inducir la muerte celular a través de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o unirse a proteínas del complemento, lo que conduce a una toxicidad celular directa, conocida como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Los ejemplos no limitantes de anticuerpos anticáncer y posibles objetivos de anticuerpos (entre paréntesis) que pueden usarse en combinación con la presente invención incluyen: Abagovomab (CA-125), Abciximab (CD41), Adecatumumab (EpCAM), Afutuzumab (CD20), Alacizumab pegol (VEGFR2), Altumomab pentetato (CEA), Amatuximab (MORAb-009), Anatumomab mafenatox (TAG-72), Apolizumab (HLA-DR), Arcitumomab (CEA), Atezolizumab (PD-L1), Bavituximab (phosphatidylserine), Bectumomab (CD22), Belimumab (BAFF), Bevacizumab (VEGF-A), Bivatuzumab mertansina (CD44 v6), Blinatumomab (CD 19), Brentuximab vedotin (CD30 TNFRSF8), Cantuzumab mertansina (mucin CanAg), Cantuzumab ravtansina (MUC1), Capromab pendetide (células de carcinoma prostático), Carlumab (CNT0888), Catumaxomab (EpCAM, CD3), Cetuximab (EGFR), Citatuzumab bogatox (EpCAM), Cixutumumab (IGF-1 receptor), Claudiximab (Claudin), Clivatuzumab tetraxetan (MUC1), Conatumumab (TRAIL-R2), Dacetuzumab (CD40), Dalotuzumab (receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I), Denosumab (RANKL), Detumomab (células de linfoma B), Drozitumab (DR5), Ecromeximab (gangliósido GD3),

Edrecolomab (EpCAM), Elotuzumab (SLAMF7), Enavatuzumab (PDL192), Ensituximab (NPC-1C), Epratuzumab (CD22), Ertumaxomab (HER2/neu, CD3), Etaracizumab (integrina $\alpha\beta 3$), Farletuzumab (receptor de folato 1), FBTA05 (CD20), Ficlaturuzumab (SCH 900105), Figitumumab (receptor de IGF-1), Flanvotumab (glicoproteína 75), Fresolimumab (TGF- β),

5 Galiximab (CD80), Ganitumab (IGF-I), Gemtuzumab ozogamicin (CD33), Gevokizumab (IL1 β), Girentuximab (anhidrasa carbónica 9 (CA-IX)), Glembatumumab vedotin (GPNMB), Ibritumomab tiuxetan (CD20), Icrucumab (VEGFR-1), Igovoma (CA-125), Indatuximab ravtansine (SDC1), Intetumumab (CD51), Inotuzumab ozogamicin (CD22), Ipilimumab (CD 152), Iratumumab (CD30), Labetuzumab (CEA), Lexatumumab (TRAIL-R2), Libivirumab

10 (antígeno de superficie de hepatitis B), Lintuzumab (CD33), Lorvotuzumab mertansina (CD56), Lucatumumab (CD40), Lumiliximab (CD23), Mapatumumab (TRAIL-R1), Matuzumab (EGFR), Mepolizumab (IL5), Milatuzumab (CD74), Mitumomab (GD3 ganglioside), Mogamulizumab (CCR4), Moxetumomab pasudotox (CD22), Nacolomab tafenatox (C242 antigen), Naptumomab estafenatox (5T4), Namatumab (RON), Necitumumab (EGFR), Nimotuzumab (EGFR),

15 Nivolumab (IgG4), Ofatumumab (CD20), Olaratumab (PDGF-R a), Onartuzumab (cinasa del receptor del factor de dispersión humano), Oportuzumab monatox (EpCAM), Oregovomab (CA-125), Oxelumab (OX-40), Panitumumab (EGFR), Patritumab (HER3), Pentumoma (MUC1), Pertuzuma (HER2/neu), Pintumomab (antígeno de adenocarcinoma), Pritumumab (vimentin), Racotumomab (ácido N-glicolilneuramínico), Radretumab (extra dominio-B de fibronectina),

20 Rafivirumab (glicoproteína de virus de la rabia), Ramucirumab (VEGFR2), Rilotumumab (HGF), Rituximab (CD20), Robatumumab (receptor de IGF-1), Samalizumab (CD200), Sibrotuzumab (FAP), Siltuximab (IL6), Tabalumab (BAFF), Tacatuzumab tetraxetan (alfa-fetoproteína), Taplitumomab paptox (CD 19), Tenatumomab (tenascina C), Teprotumumab (CD221), Ticilimumab (CTLA- 4), Tigatuzumab (TRAIL-R2), TNX-650 (IL13), Tositumomab (CD20),

25 Trastuzumab (HER2/neu), TRBS07 (GD2), Tremelimumab (CTLA-4), Tucotuzumab celmoleukin (EpCAM), Ublituximab (MS4A1), Urelumab (4-1BB), Volociximab (integrina $\alpha\beta 1$), Votumumab (antígeno de tumor CTAA 16.88), Zalutumumab (EGFR), y Zanolimumab (CD4).

La cita de documentos y estudios a los que se hace referencia en este documento no pretende ser una admisión de que cualquiera de los anteriores sea técnica anterior pertinente.

30 Todas las declaraciones sobre el contenido de estos documentos se basan en la información disponible para los solicitantes y no constituyen ninguna admisión en cuanto a la exactitud del contenido de estos documentos.

EJEMPLOS

35 La invención se describe adicionalmente en detalle con referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, la invención no

debe interpretarse de ninguna manera como limitada a los siguientes ejemplos, sino que debe interpretarse que abarca todas y cada una de las variaciones que se hagan evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

5 Sin descripción adicional, se cree que un experto en la técnica puede, usando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, fabricar y usar los compuestos de la presente invención y practicar los métodos reivindicados. Por lo tanto, los siguientes ejemplos de trabajo señalan específicamente las modalidades preferidas de la presente invención, y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera el resto de la invención.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

10 Las técnicas y métodos usados en este documento se describen en este documento o se llevan a cabo de una manera conocida *per se* y como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Todos los métodos, incluido el uso de kits y reactivos, se llevan a cabo de acuerdo con la información del fabricante, a menos que se indique específicamente.

15 Construcción CAR

Se usó un vector de autoactivación gamma-retroviral (SIN) pES.12-6 para sobreexpresar de manera estable el CLDN6-CAR-BBz en células T humanas bajo el control de un promotor eucariota interno, la versión corta sin intrones de la elongación humana. promotor del factor 1-
20 alfa (EFS - 213/+ 31). El esqueleto del vector contiene las secuencias de tipo salvaje de MLV de las regiones R y U5 en las LTRs 5' y 3', así como la región de empaquetamiento (psi y psi+). Se eliminaron los elementos potenciadores de la región U3 de la 3'-LTR (incluido CAAT-Box) y se mutó la secuencia de TATA-Box para evitar el inicio de la transcripción. La versión truncada del elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis de la marmota (WHV) se usa para prevenir la expresión de proteínas virales no deseadas.

25 El CLDN6-CAR-BBz comprende un péptido de señalización de IgG humana, un fragmento Fv de cadena sencilla del anticuerpo específico de CLDN6 IMAB206 (Ganymed Pharmaceuticals) con un enlazador (G4S) 3 entre las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) que contiene una sustitución de cisteína a serina en la posición 46 de la V_L (posición 45 de la V_L mostrada en la lista de secuencias). El fragmento scFv se fusiona con la bisagra de CD8α
30 humana y la región transmembrana seguida de restos de señalización 4-1BB humanos y CD3zeta (Q14K) humanos.

Líneas celulares y reactivos

La línea celular de teratoma que expresa CLDN6 humano PA-1-SC12_A0201_luc_gfp se cultivó en medio MEM-GlutaMAX complementado con FCS (Biochrom) al 10% (v/v), piruvato
35 de sodio 1 mM (Gibco), solución de aminoácidos no esenciales MEM 1 mM (Gibco) y solución de bicarbonato de sodio al 2% (v/v) (Gibco). La línea celular sobreexpresa HLA-A*0201,

luciferasa y GFP.

La línea celular de carcinoma de ovario OV-90-SC12 se cultivó en 41.5% (v/v) de medio MCDB 105 (Sigma-Aldrich), 41.5% (v/v) de Medio 199 (Sigma Aldrich) suplementado con 15% (v/v) FCS y 2% (v/v) de solución de bicarbonato de sodio al 7.5%.

5 El medio de cultivo de la línea celular de melanoma humano SK-MEL-37 está compuesto de 90% de DMEM GlutaMAX™ (Gibco) suplementado con 10% (v/v) de FCS.

El medio de cultivo para MDA-MB-231 está compuesto de 88% (v/v) de RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) y se complementó con FCS al 10%, piruvato de sodio 1 mM, solución de aminoácidos no esenciales MEM 1 mM.

10 La línea celular de adenocarcinoma humano 23132-87 y la línea celular de melanoma humano MEL-526 se cultivaron en RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) al 90% (v/v) suplementado con FCS inactivado por calor al 10% (v/v).

El medio de cultivo para HEK-293 estaba compuesto por un 90% (v/v) de Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM) (ATCC) y un 10% (v/v) de FCS.

15 Se cultivó SKOV-3 en medio McCoy 5A (ATCC) al 90% (v/v) suplementado con FCS al 10% (v/v).

La línea celular de ovario humano NIH-OVCAR-3 se cultivó en 80% (v/v) de RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco, Cat-No. 61870) suplementado con 20% (v/v) de FCS y 0.1% (p/v) de insulina (Sigma-Aldrich).

20 Las líneas de células tumorales humanas LCLC-103H, COLO-699-N, JAR y NEC-8 se cultivaron en RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) al 90% (v/v) suplementado con FCS al 10% (v/v).

La siembra y/o división de las líneas celulares se llevó a cabo cada 2 o 3 días.

Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y células dendríticas (DCs)

25 Las PBMCs se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll®-Hypaque (1.077 g/mL de Amersham Biosciences) a partir de capas leucocíticas. Los monocitos se enriquecieron con microperlas anti-CD14 (Miltenyi Biotec). Las DCs inmaduras (iDCs) se diferenciaron mediante cultivo en medio de DC que constaba de RPMI 1640 GlutaMAX™, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales y suero AB humano inactivado con calor al 5% (v/v) (todos de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) suplementado con 1000 U/mL h de GM-CSF (Essex, Lucerne, Suiza) y 1000 U/mL h de IL-4 (Strathmann Biotech, Hamburgo, Alemania).

Transducción de células T

35 Las células T se enriquecieron a partir de PBMCs mediante separación magnética de células T CD3⁺/CD28^{high+} usando Dynabeads® Human T-Expander CD3/CD28 CTS. Las células se incubaron con perlas a una proporción de células T CD3⁺ de tres a uno y se separaron usando un imán CTS DynaMag. Se cultivaron células T enriquecidas en medio X-VIVO 15

suplementado con suero humano al 5% (v/v) en presencia de 450 U/mL de rh IL-7 y 50 U/mL de rh IL-15 (ambos de Miltenyi Biotec). Tres días después, las perlas de CD3/CD28 se eliminaron usando un imán y las células T preactivadas se transdujeron con vectores retrovirales en presencia de Protransduzin®-A a una concentración final de 25 µg/mL. Las células se expandieron hasta el día 7 o el día 10 en medio de cultivo completo y se usaron directamente para evaluar la expresión de la superficie de CAR, el fenotipo de las células T y las funciones efectoras o se crioconservaron.

Análisis de citometría de flujo de células cultivadas *in vitro*

La expresión de la superficie celular de los CARs transducidos se analizó usando un anticuerpo específico de idiotipo conjugado con Alexa-Fluor-647 (Ganymed Pharmaceuticals) que reconoce el fragmento scFv contenido en todas las construcciones CLDN6-CAR. La expresión de la superficie de CLDN6 en las células objetivo se analizó mediante tinción con un anticuerpo específico de CLDN6 conjugado con Alexa-Fluor647 IMAB027 (Ganymed Pharmaceuticals). La medición de citometría de flujo se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACSCanto™ II usando el software FACSDiva™ (BD Biosciences) y el análisis se llevó a cabo usando FlowJo® V10 (treestar inc.).

PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Se aisló el ARN total de las líneas celulares indicadas usando RNeasy® Mini Kit (QIAGEN). Para la transcripción inversa de ARN con el fin de obtener ADNc para qRT-PCR, se usó el kit de reactivos PrimeScript™ RT con gDNA Eraser (TAKARA) comenzando con 1 µg de ARN total. La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo usando el kit QuantiTect SYBR® Green PCR (QIAGEN) con los siguientes cebadores (5'-3'): *CLDN6*-for: CTT ATC TCC TTC GCA GTG CAG, *CLDN6*-rev: AAG GAG GGC GAT GAC ACA GAG, *HPRT1*-for: TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA, *HPRT1*-rev: GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT (temperatura de fijación: 62°C).

Ensayo de citotoxicidad xCELLigence

Para la evaluación de la citotoxicidad mediada por CAR se usó el sistema xCELLigence (OMNI Life Science). Las mediciones de impedancia del índice celular (CI) se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se determinó la densidad celular óptima que da como resultado una curva de crecimiento exponencial para cada línea de células tumorales. Las células objetivo se sembraron a concentraciones de 2-104 células por pocillo en E-plate 96 PET (ACEA Biosciences Inc.). Después de 24 h, se añadieron números variables de células T transducidas con CAR en un volumen final de 200 µl y se monitorizaron cada 30 min durante un período de hasta 48 h mediante el sistema xCELLigence.

El porcentaje de lisis específica se calculó de la siguiente manera:

$$(CI_{Lmin} - CI_{muestra}) / CI_{Lmin} \times 100$$

La desviación estándar se calculó de la siguiente manera:

$$100 \times (CI_{\text{muestra}} / CI_{L_{\min}}) \times \sqrt{\{(STDEV \text{ de } CI_{\text{muestra}} / CI_{\text{muestra}})^2 + (STDEV \text{ de } CI_{L_{\min}} / CI_{L_{\min}})^2\}}$$

El índice celular máximo correspondiente a la lisis mínima ($L_{\min}$) se evaluó después de
5 incubar las células objetivo con células T efectoras que expresan un antígeno de control (por ejemplo, eGFP, control-CAR).

Ensayo de proliferación de CFSE (éster succinimidílico de carboxifluoresceína)

Para determinar el porcentaje de células T proliferantes después de la estimulación específica de antígeno, las células T que expresan CAR se marcaron con 1.6 μM del tinte
10 fluorescente éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) durante 10 min a 37°C (protegido de la luz). Para eliminar cualquier tinte libre, se añadió FCS puro a las células y se incubó durante 5 minutos más. Las células se lavaron, se resuspendieron en medio de cultivo y se cocultivaron con células objetivo usando diferentes proporciones de efector a objetivo (E:T) en un volumen total de 200 μL de medio DC en placas de fondo redondo de 96
15 pocillos. Después de 5 días de cocultivo, las células se tiñeron con anticuerpos conjugados con fluorocromo dirigidos por ejemplo, contra CD4, CD8 y el CAR. El porcentaje de células T en proliferación se analizó mediante citometría de flujo con base en la reducción progresiva a la mitad de la fluorescencia CFSE dentro de las células hijas después de las divisiones celulares usando un citómetro de flujo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson).

Ensayo de esferoides (IncuCyte®)

Los esferoides tumorales se generaron cultivando 1×10^4 células PA1-SC12-A2-eGFP por pocillo en medio MEM-GlutaMAX suplementado con FCS al 10% (v/v), 1% (v/v) Na-Pyruvat, 1% (v/v) de MEM NEAA y bicarbonato de sodio al 2% (v/v) en una placa de pocillos de fondo redondo Corning® Costar® Ultra-Low Attachment de 96 pocillos durante 48 h después de la
25 centrifugación. Se agregaron células T con CAR (1×10^5 /pocillo) y se obtuvieron imágenes de esferoides tumorales que expresan eGFP con un aumento de 4 veces y un tiempo de exposición de 300 ms para detectar fluorescencia verde en un sistema de imagenología de contenido en vivo IncuCyte Zoom (Essen Bioscience) a 37°C, cinco % de CO_2 . Las imágenes se adquirieron cada hora durante 10 días. Los datos se analizaron usando el software de análisis IncuCyte
30 para detectar y cuantificar la intensidad integrada total del objeto verde ($\text{GCU} \times \mu\text{m}^2/\text{Imagen}$). Los promedios de recuentos de objetos verdes con SD en cada punto de tiempo se trazaron usando el software de análisis IncuCyte.

Generación de ARNm transcrito *in vitro* (IVT)

Las transcripciones *in vitro* de ARNm que codifican para antígenos se basaron en las
35 estructuras del plásmido pST1-T7-GG-hAg-MCS-2hBg-A30LA70 y las construcciones de ADN derivado. Estas construcciones de plásmido contienen además del ORF de longitud completa

la α -globina humana 5', dos UTRs de β -globina humana 3' en serie y una cola poli(A) de 100 nucleótidos, con un enlazador después de 70 nucleótidos. Los ARNm que codifican para antígenos se generaron mediante transcripción *in vitro* como describen Holtkamp S. et al. (2006) Blood 108 (13): 4009-17. La transcripción *in vitro* de todas las construcciones de ARNm descritas se llevó a cabo en BioNTech RNA Pharmaceuticals GmbH.

Generación de antígeno formulado en liposomas que codifica para ARN de IVT (ARN_(LIP)) y transfección *in vitro* de células dendríticas

La complejación del antígeno que codifica para el ARN de IVT con liposomas se describió previamente en Kranz et al (2016) Nature 534 (7607): 396-401. Se usó una relación de carga de 1.3 a 2 de DOTMA catiónico y ARN. Además de DOTMA, la fracción lipídica contiene el lípido auxiliar DOPE en una proporción molar de 2:1 DOTMA por DOPE.

Técnicas experimentales con animales

Animales

Se usaron ratones NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) hembra inmunodeficientes de nueve a 21 semanas de edad para estudios *in vivo*. Las parejas reproductoras se compraron en el laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME, EE.UU.) y se criaron en las instalaciones para animales de BioNTech AG, Alemania. Se adquirieron ratones C57BL/6BrdCrHsd-Tyrc de Envigo Labs. Se usaron animales emparejados por edad (8-10 semanas) y sexo (macho o hembra) a lo largo de los experimentos. Se criaron ratones congénicos C57Bl/6-Thy1.1 en la instalación de animales de BioNTech AG, Alemania. Todos los experimentos se llevaron a cabo en condiciones libres de patógenos específicos (SPF) y de acuerdo con las regulaciones alemanas de experimentación animal.

Injerto de células tumorales

Se inyectaron subcutáneamente 5×10^6 OV90-SC12 o 5×10^5 células tumorales CT26 (en 100 μ L de PBS) en el flanco trasero derecho de los ratones. La monitorización del crecimiento tumoral y el cálculo del volumen se determinaron usando un calibre y se insertaron en la fórmula $V = \frac{1}{2} (\text{largo} \times \text{ancho}^2)$. La transferencia adoptiva previa de células T humanas diseñadas con CAR, portadoras de tumores, se estratificó usando el complemento XL Toolbox de Daniels para Microsoft Excel para lograr distribuciones enormes del volumen del tumor entre los diferentes grupos de tratamiento.

Transferencia de células adoptivas (ACT) de células T humanas

Se inyectaron por vía intravenosa diferentes cantidades de células T humanas totales transducidas con rayos gamma-retrovirales (el número y la frecuencia de células T que expresan el transgén CAR o GFP se indican en las figuras respectivas) en el plexo retrobular en 200 μ L de PBS. Dependiendo del entorno experimental, las células T transducidas se usaron directamente después del proceso de activación y transducción *in vitro* o las células T

transducidas criopreservadas se descongelaron y se transfirieron adoptivamente directamente después de 2 lavados con PBS a ratones, respectivamente. La viabilidad de cada producto de células T usado en el experimento fue >90%.

Monitoreo de células T con CAR humano *in vivo* en sangre

5 En los puntos de tiempo indicados, se recuperaron 50 µL de sangre periférica de la vena retroorbital y se recogieron en tubos de reacción que contenían heparina (Sarstedt). Los glóbulos rojos se lisaron usando BD FACS Lysing solution (BD). La expresión de CAR en la superficie de las células T humanas transferidas se analizó usando hCD45-PE-Cy7 (HI30, BD), hCD4-APC-Cy7 (OKT4, BioLegend), hCD8-BV421 (RPA-T8, BD) y anticuerpo específico de
10 idiotipo conjugado a Alexa-Fluor 647 (Ganymed Pharmaceuticals). Las células muertas se discriminaron del análisis usando 7-AAD (Beckmann Coulter). La medición de citometría de flujo se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACSCanto™ II usando el software FACSDiva™ (BD Biosciences) y el análisis se llevó a cabo usando FlowJo® V10 (Treestar inc.).

Manipulación de genes retrovirales y preparación de células T con CAR para la 15 transferencia de células T adoptivas

Los esplenocitos de C57Bl/6-Thy1.1+ sin tratamiento previo o Balb/c-Thy1.1+ se aislaron y preactivaron mediante Dynabeads™ Mouse T-Activator CD3/CD28 en una proporción de perlas a células T de 1:1 (Invitrogen) en presencia de 5 ng/mL de IL-7 humana recombinante (rh) y 5 ng/mL de IL-15 rh (Miltenyi Biotec). Para la transducción de células murinas, los
20 sobrenadantes retrovirales pseudotipificados de MLV-E se cargaron en placas de pocillos tratadas con cultivo no tisular recubiertas con RetroNectin (2 µg/cm²) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Takara Bio Inc., Otsu, Japón), con 3 ciclos repetidos de carga de virus y centrifugación (1300 xg, 15°C, 15 min) para aumentar la unión. 24 h después de la preactivación, se centrifugaron 0.5-0.6x10⁶ células/cm² (300 xg, 37°C, 1 h) en pocillos
25 recubiertos con partículas virales. Después del cultivo durante la noche, se repitió la transducción por centrifugación con placas recubiertas con partículas virales recién preparadas. 72 h después de la preactivación, se retiraron del cultivo Dynabeads™ Mouse T-Activator CD3/CD28 y las células se expandieron en presencia de 5 ng/mL de rh IL-7 y 5 ng/mL de rh IL-15. Después de la limpieza con ficoll, las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar
30 las proteínas del suero y luego se prepararon para la transferencia celular adoptiva (ACT). Vectores retrovirales a base de pES12.6 que contenían CLDN6-CAR-BBz codificado y luciferasa de luciérnaga mejorada (effLuc; Rabinovich et al. BA, PNAS (2008) PNAS 105 (38): 14342-6) y gen reportero de eGFP (proteína de fluorescencia verde mejorada), que se expresa por separado usando elementos de empalme 2A (Szymczak et al. AL, Nature Biotechnology, 35 (2004) Nat Biotechnol. 22 (5): 589-94) se usaron para la transducción.

Transferencia de células T adoptivas de células T murinas y vacunación con ARN_(LIP)

Se transfirieron por vía intravenosa (i.v.) células T congénicas de CAR transducidas con rayos gamma-retrovirales a ratones donantes C57BL/6BrdCrHsd-*Tyr*^c o BALB/c irradiados por todo el cuerpo (XRAD320), respectivamente. Posteriormente, los ratones se vacunaron por vía intravenosa (i.v.) con una relación F12:ARN de 1.3:2 de ARN_(LIP) codificador de antígeno en varios puntos de tiempo después de ACT. La expansión de CAR *in vivo* se analizó mediante imágenes de bioluminiscencia de cuerpo entero y la eficacia antitumoral se analizó mediante monitorización tumoral.

Imágenes de luciferasa *in vivo* (BLI)

La expansión y distribución de células T transducidas con CAR-effLuc-GFP se evaluaron mediante imágenes de bioluminiscencia *in vivo* usando el sistema de imágenes IVIS Lumina (Caliper Life Sciences). Brevemente, se inyectó i.p. una solución acuosa de D-luciferina (80 mg/kg de peso corporal; Perkin Elmer) en los puntos de tiempo indicados después de la transferencia adoptiva de células T transducidas. Cinco minutos después, se cuantificaron los fotones emitidos (tiempo de integración de 1 minuto, agrupamiento 8). La bioluminiscencia *in vivo* en las regiones de interés (ROI) se cuantificó como flujo total (fotones/seg) usando el software IVIS Living Image 4.0. La intensidad de la luz transmitida que se origina en las células que expresan luciferasa dentro del animal se representó como una imagen en escala de grises, en donde el negro es el menos intenso y el blanco al gris oscuro la señal de bioluminiscencia más intensa. Se obtuvieron imágenes de referencia en escala de grises de ratones bajo iluminación LED con poca luz. Las imágenes se superpusieron usando el software Living Image 4.0.

Análisis estadístico y representación de datos

Todos los resultados se representan con la media $\pm$ DE de las réplicas técnicas o la media $\pm$ SEM de las réplicas biológicas. El número de muestras replicadas se indica en la descripción de la figura de cada experimento. Se usó la prueba t de Student de dos colas para datos no apareados para la comparación del área bajo la curva (AUC) de dos grupos. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando GraphPad PRISM 6.04. *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

Ejemplo 2: Generación y caracterización *in vitro* de CAR específicos de CLDN6

Para la selección de la estructura principal, generamos diferentes cadenas principales de CAR que comparten el mismo fragmento scFv derivado del anticuerpo específico de CLDN6 IMAB206-C46S, pero difieren en sus dominios bisagra y coestimuladores (Figura 1A). Como se ha demostrado que la coestimulación con 4-1BB aumenta la persistencia y la eficacia antitumoral de las células T con CAR, incluimos cadenas principales de CAR de segunda y

tercera generación que contienen el endodominio 4-1BB. Como alternativa o además, se incorporó un dominio CD28 modificado (Kofler DM et al., (2011) *Molecular Therapy* 19 (4), 760-767) que se sabe que administra la coestimulación mediada por CD28 a la célula T diseñada en ausencia de agonistas Ligandos CD28 tales como B7.1 y B7.2. Los fragmentos scFv se fusionaron con los dominios coestimuladores 4-1BB o CD28 mediante una IgG Fc modificada (Hombach A. et al., (2010) *Gene Therapy* 17, 1206-1213) o una región de bisagra CD8 α .

Los diferentes CLDN6-CAR se caracterizaron extensamente *in vitro* por su potencial para reconocer y destruir de manera sensible y específica las células tumorales que expresan CLDN6. Entre otros experimentos, se llevó a cabo un ensayo de esferoides tumorales usando células T transducidas con CAR en combinación con eGFP que expresaban esferoides tumorales PA1. De hecho, se pudo detectar una lisis acelerada de esferoides tumorales que expresan CLDN6 por CAR que contienen 4-1BB en comparación con un CAR que lleva el dominio CD28 usando imágenes en tiempo real IncuCyte® (Figura 1B).

Con base en el resumen de los resultados de diferentes estudios de caracterización funcional, seleccionamos CLDN6-CAR-CD8h-BBz como estructura principal para pruebas preclínicas y clínicas, ya que pudimos demostrar un reconocimiento altamente específico y sensible de CLDN6, así como un alto potencial de supervivencia y estimulación repetitiva de las células T con CAR diseñadas por ingeniería genética. Es importante destacar que esta columna vertebral de CAR ya se usó con éxito en varios ensayos de células T CD19-CAR. Para la integración estable de nuestro CLDN6-CAR en el genoma de las células T, seleccionamos el vector γ -retroviral auto-inactivante (SIN) pES12.6 para la integración estable del CLDN6-CAR terapéutico en el genoma de las células T (Loew et al., *Gene Therapy* (2010) 17, 272-280).

Ejemplo 3: Sensibilidad del CLDN6-CAR-BBz

Para analizar la sensibilidad del reconocimiento mediado por CAR con más detalle, se llevó a cabo un experimento de titulación CLDN6-RNA. Con ese objetivo, la línea celular de carcinoma de pulmón CLDN6-negativa Colo699-N se transfectó con cantidades tituladas de CLDN6-RNA, y la lisis de células objetivo mediada por CLDN6-CAR se evaluó mediante el ensayo de citotoxicidad xCELLigence. La expresión de superficie de CLDN6-CAR en células T transducidas (Figura 2A) y los niveles de expresión de la proteína CLDN6 en células Colo699-N transfectadas (Figura 2B) se evaluaron mediante citometría de flujo después de la tinción con anticuerpos específicos de CLDN6-CAR y CLDN6. Se pudo observar la destrucción específica de células objetivo transfectadas con CLDN6-ARN por células T que expresan CLDN6-CAR dependiendo de la dosis de CLDN6-ARN usada para la transfección de células Colo699-N que se correlaciona con el número de moléculas CLDN6 en la superficie de la célula objetivo evaluada por citometría de flujo (Figura 2C). Las células T con CAR incluso mediaban la lisis, si se expresaban números muy bajos de moléculas CLDN6 en la superficie de la célula objetivo

después de la transfección de solo 0.01 µg de CLDN6-ARN, que apenas eran detectables por citometría de flujo.

Ejemplo 4: Seguridad del CLDN6-CAR-BBz

Para evaluar la seguridad del CLDN6-CAR-BBz se llevó a cabo un ensayo de selección de líneas celulares. Con ese objetivo, se cultivaron células T transducidas con CLDN6-CAR-BBz (Figura 3A) con un panel de líneas de células tumorales CLDN6 positivas y CLDN6 negativas de diferentes orígenes de tejido (Figura 3B) y se analizó el reconocimiento y la lisis de las células objetivo mediante Ensayo de citotoxicidad xCELLigence (Figura 3C). En paralelo, se evaluó el nivel de expresión de ARNm y proteína de CLDN6 en las líneas celulares objetivo mediante qRT-PCR y citometría de flujo, respectivamente (Figuras 3D, 3E). Se pudo demostrar que el reconocimiento y la lisis de las líneas celulares objetivo están estrictamente correlacionados con los niveles de expresión de ARNm y proteínas de CLDN6.

Ejemplo 5: Proliferación de células T con CAR

Un requisito previo esencial para la eficacia antitumoral de las células T diseñadas con CLDN6-CAR-BBz es su capacidad para proliferar y persistir en el paciente. Para analizar, si las células T CLDN6-CAR proliferan eficazmente en respuesta a CLDN6 expresado ectópicamente en IDC, se llevó a cabo un ensayo de cocultivo *in vitro* a base de CFSE. Las células T transducidas con CLDN6-CAR se marcaron con CFSE y se cocultivaron con IDCs autólogas transfectadas con cantidades tituladas de lipoplejos de ARN (ARN_(LIP)) que codificaban para CLDN6 o un antígeno de control. La expresión de superficie de CLDN6-CAR en células T y CLDN6 en células objetivo se verificó mediante citometría de flujo (Figuras 4A, 4B). Después de cinco días de cocultivo, se analizó la proliferación específica de antígeno de células T CD4+ y CD8+ que expresan CAR marcadas con CFSE mediante citometría de flujo (Figura 4C).

La proliferación dependiente de la dosis mediada por CLDN6-CAR se correlaciona con la cantidad de CLDN6-ARN_(LIP) transfectado, mientras que solo se puede observar la proliferación de fondo, si las IDCs se transfectan con ARN_(LIP) de control. Estos datos confirman que la expansión específica de antígeno eficaz de las células T CLDN6-CAR-BBz se induce después de la estimulación específica de antígeno.

Ejemplo 6: Eficacia antitumoral *in vivo* del CLDN6-CAR-BBz

Después de que se haya demostrado *in vitro* la inducción de funciones efectoras específicas de antígeno mediada por CAR, se investigó *in vivo* el potencial terapéutico de las células T CLDN6-CAR-BBz humanas en un modelo de tumor de xenoinjerto avanzado. En este sentido, ratones NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) inmunodeficientes se injertaron subcutáneamente con células de carcinoma de ovario humano que expresan endógenamente CLDN6 (OV90). A continuación, se trataron ratones NSG que portaban tumores OV90 con una dosis única de 1×10^7 CLDN6-CAR o células T transducidas con eGFP (aproximadamente 5×10^8

células T/kg) administradas i.v. (Figura 5A). El CLDN6-CAR se expresó en aproximadamente el 16-18% de las células T CD4⁺ y CD8⁺ humanas (Figura 5B). Es de destacar que la transferencia adoptiva de células T CLDN6-CAR condujo a la regresión completa de tumores grandes con un volumen tumoral medio de 170 mm³ en el día de la transferencia adoptiva, mientras que no se pudo observar ningún efecto antitumoral en el grupo de control (Figura 5C). Este efecto antitumoral significativo se correlacionó con la persistencia de las células T CLDN6-CAR-BBz en la sangre periférica de los ratones tratados (Figura 5D).

Ejemplo 7: Funcionalidad *in vitro* de células T con CAR cultivadas a corto y largo plazo

Dado que la fabricación reproducible de productos de células T con CAR de grado clínico y de alta calidad es un requisito previo para las pruebas clínicas, el proceso de fabricación de GMP se optimizó para lograr altas eficiencias de transducción y una cantidad y calidad suficientes de células T que expresan CLDN6-CAR. El procedimiento de transducción también se simplificó reduciendo el número de transducciones de dos a uno y acortando el tiempo de cultivo *ex vivo* de 10 a 7 días. Se ha demostrado que las células T cultivadas durante un corto período de tiempo muestran una eficacia mejorada en comparación con las células T expandidas y agotadas a largo plazo (PMID: 30030295). En consecuencia, el acortamiento del tiempo de cultivo no solo ahorra tiempo y costos, sino que, lo que es más importante, debería conducir a un mayor potencial de las células T diseñadas para expandirse y persistir en el paciente.

Con el fin de comparar la eficacia antitumoral *in vitro* de células T CLDN6-CAR-BBz cultivadas a corto plazo (7 días) y a largo plazo (10 días), se llevó a cabo un experimento con esferoides a largo plazo. La evaluación de la expresión de la superficie de CAR mediante citometría de flujo reveló niveles de expresión de CAR casi comparables, mientras que la frecuencia de células T positivas para CAR fue ligeramente menor en la muestra de células T cultivadas durante 7 días (Figura 6A). Con el fin de analizar el potencial de destrucción repetitiva, se cultivaron conjuntamente células T con CAR con CLDN6 y eGFP que expresaban esferoides tumorales PA1-SC12-A2-eGFP y se controló la destrucción de esferoides tumorales en tiempo real con base en la señal de eGFP usando el sistema IncuCyte®. Después de la erradicación completa del esferoide tumoral, se añadió un esferoide tumoral novedoso (Figura 6B). Se pudo demostrar que las células T con CAR cultivadas a corto plazo tienen un potencial comparable para la muerte repetitiva como las células T cultivadas a largo plazo.

Ejemplo 8: Funcionalidad *in vivo* de células T con CAR fabricadas con GMP descongeladas

Dado que el proceso de transducción de GMP destinado a uso clínico genera un producto de células T con CAR criopreservadas, fue de gran importancia validar el potencial

antitumoral de las células T CLDN6-CAR-BBz descongeladas diseñadas en las instalaciones de GMP. Además, tal como el proceso de fabricación final de GMP podría acortarse (cosecha el día 7 en lugar del día 10), esta modificación en el protocolo final tuvo que evaluarse mediante la modalidad de un estudio *in vivo*. Lo más importante es que las células T CLDN6-CAR-BBz humanas descongeladas demostraron una efectividad antitumoral significativa comparable a las células T con CAR recién generadas y tumores avanzados erradicados con un volumen tumoral medio de 160 mm³ en el modelo de xenoinjerto de carcinoma de ovario (Figura 7A). Más aún, las células T con CAR recolectadas en el día 7 o 10 que mostraban una expresión de superficie CAR similar (Figura 7B) se compararon por su eficacia antitumoral en este experimento (Figura 7C). En correlación con los resultados del experimento de esferoide tumoral a largo plazo, ambos productos de células T con CAR mediaron el rechazo completo del tumor con cinéticas comparables. Las respuestas antitumorales de ambos productos se correlacionaron con la persistencia de las células T CLDN6-CAR-BBz en sangre periférica dos semanas después de la transferencia adoptiva (Figura 7D).

Ejemplo 9: Mayor persistencia de células T transducidas CLDN6-CAR-BBz

El éxito clínico de la terapia con células T reactivas tumorales transferidas adoptivamente también se ha correlacionado positivamente con la persistencia de esas células *in vivo* (Robbins et al. (2004) J Immunol. 173 (12): 7125-30, Huang et al. (2005)) 28 (3): 258-67). Por lo tanto, analizamos si la exposición al antígeno *in situ* podría mejorar la persistencia de las células T CLDN6-CAR-BBz *in vivo*. Dado que un modelo de xenoinjerto no es suficiente para estudiar la persistencia a largo plazo de células T con CAR debido a la enfermedad de injerto contra huésped de células T humanas en tejidos murinos, así como la falta de células inmunes endógenas en competencia, estudios de persistencia de CLDN6-CAR-BBz T las células se llevaron a cabo en un modelo murino singénico de ratón. Por lo tanto, las células T murinas transducidas con CAR de CLDN6-CAR-BBz de luciferasa se transfirieron adoptivamente a ratones levemente irritados (2.5 Gy) seguido de la administración repetida de ARN_(LIP) que codifica para CLDN6 o un antígeno de control y expansión de la población de células T con CAR se controló secuencialmente mediante imágenes de bioluminiscencia (Figura 8A).

Las células T CLDN6-CAR-BBz pueden persistir (más de 3 meses) *in vivo* después de la vacunación repetitiva con antígeno CAR formulado liposómicamente *in vivo*. Las células CART desaparecen con el tiempo en el grupo de control, mientras que las células T con CAR reestimuladas con antígeno específico proliferan después de cada tratamiento con ARN_(LIP), incluso después de una pausa de tratamiento de 3-4 semanas después de una ronda de refuerzo de 3° y 4° (Figuras 8B y 8C). Estos datos demuestran que la tecnología de ARN_(LIP) de BioNTech respalda la activación y proliferación adecuadas de las células T CLDN6-CAR-BBz al

proporcionar coestimulación natural *in situ*, lo que también conduce a una mayor persistencia de las células T CLDN6-CAR-BBz expandidas *in vivo*.

Ejemplo 10: Actividad antitumoral mejorada de células T CLDN6-CAR-BBz expandidas *in vivo*

Después de que se demostró la expansión y persistencia específica de antígeno mediada por CAR, surgió la pregunta de si las células T CLDN6-CAR-BBz expandidas *in vivo* también muestran un potencial antitumoral mejorado en comparación con las contrapartes no expandidas. Para este propósito, ratones Balb/c inoculados con la línea celular CT26 de carcinoma de colon que expresa CLDN6^{dim} se trataron con una dosis moderada de 1×10^6 de CLDN6-CAR-BBz o de células T murinas transducidas Control-CAR-BBz ($3-4 \times 10^5$ de células T que expresan CAR). Después de la administración i.v. de células T con CAR, los ratones recibieron una vacunación adicional con 20 µg de ARN_(LIP) que codifica para CLDN6 de longitud completa o antígeno de control de longitud completa (Figura 9A). No se ha observado ningún efecto antitumoral en animales tratados con Control-CAR-BBz tratados con CLDN6-RNA_(LIP) y solo se pudo lograr una ligera regresión tumoral cuando los ratones fueron tratados con la dosis moderada de células T CLDN6-CAR-BBz en combinación con ARN_(LIP) ctrl no relevante. Sin embargo, los ratones que recibieron la combinación de la dosis moderada de células T con CAR junto con la vacuna CLDN6-RNA_(LIP) para lograr la expansión *in vivo* de las células T CLDN6-CAR-BBz mostraron una regresión tumoral notablemente mejorada (Figura 9B).

Ejemplo 11: Eficacia antitumoral restaurada de células T con CAR expandidas *in vivo* en dosis bajas

Además del potencial de la expansión de células T con CAR *in vivo* a base de ARN_(LIP) para mejorar una respuesta antitumoral en curso, también se podría demostrar que esta tecnología es adecuada para restaurar el potencial antitumoral de una célula T CAR insuficiente dosis. Los ratones portadores de tumores se trataron con una dosis de células T con CAR 10 veces menor que la necesaria para el rechazo del tumor (Figura 10A). Si bien se observó crecimiento tumoral en ratones tratados con ARN_(LIP) de control, todos los animales mostraron rechazo tumoral que recibieron ARN_(LIP) que codifica para el antígeno CAR después del trasplante inicial (Figura 10C). Por consiguiente, las frecuencias de células T con CAR trasplantadas en sangre periférica fueron notablemente más altas después de la vacunación (Figura 10D). La compensación de una dosis insuficiente de células T con CAR después del trasplante mediante un tratamiento adicional con ARN_(LIP) para lograr una expansión *in vivo* puede ser muy útil para al menos dos escenarios diferentes: 1) bajo rendimiento de producto de células T con CAR fabricado con GMP (por ejemplo, debido a recuento bajo de linfocitos en la aféresis inicial u otras razones no influyentes) o 2) evitación de EAG mediante la reducción de la dosis inicial de células T con CAR (especialmente, si se sabe que la CAR necesaria causa

toxicidades o en el caso de la primeros estudios de escalada de dosis en humanos).

- Las descripciones de todas y cada una de las patentes, solicitudes de patente y publicaciones citadas en este documento se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Si bien esta invención se ha descrito con referencia a modalidades específicas, es evidente que
- 5 otros expertos en la técnica pueden idear otras modalidades y variaciones de esta invención sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la invención. Se pretende que las reivindicaciones adjuntas incluyan todas estas modalidades y variaciones equivalentes.