

PARTÍCULAS LENTIVIRALES QUE EXHIBEN MOLÉCULAS DE FUSIÓN Y SUS USOS

REFERENCIA CRUZADA

[0001] La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional US N.º 63/422.678, presentada el 4 de noviembre de 2022, solicitud provisional US N.º 63/422,920, presentada el 4 de noviembre de 2022, solicitud provisional US N.º 63/487.784, presentada el 1 de marzo de 2023, solicitud provisional US N.º 63/466.471, presentada el 15 de mayo de 2023, y solicitud provisional US N.º 63/579.188, presentada el 28 de agosto de 2023, cuyas solicitudes se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA DEL LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud se presenta junto con un listado de secuencias en formato electrónico. El listado de secuencias se proporciona como un archivo titulado 061479-508001WO_SeqList_ST26.xml, creado el 3 de noviembre de 2023, con un tamaño de 236 kilobytes. La información en formato electrónico del listado de secuencias se incorpora por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[0003] La presente divulgación se refiere en general a la biología celular, la inmunología y la medicina, y más concretamente a las partículas lentivirales para su uso en tratamientos médicos.

ANTECEDENTES

[0004] La terapia celular suele emplear la transducción de células inmunitarias ex vivo para generar una población de células terapéuticas que se introducen en el paciente. Las células T pueden modificarse genéticamente para su uso como agentes terapéuticos. Por ejemplo, las células T de origen autólogo o alogénico pueden transducirse ex vivo con un vector que codifica un receptor de antígeno quimérico. Las células T CAR resultantes se infunden entonces al paciente. Algunas células T con receptores de antígenos quiméricos (CAR) han sido aprobadas como tratamientos para tumores líquidos. Se necesitan métodos y composiciones mejorados para potenciar las células T. La ingeniería genética de las células T puede requerir la administración de polinucleótidos en las células T seleccionadas para la ingeniería, un procedimiento denominado transducción. La transducción de las células T puede lograrse utilizando diversos vehículos de administración virales y no virales. En un ejemplo, se utiliza un lentivirus recombinante para la transducción. La partícula lentiviral puede modificarse

para que muestre en su superficie moléculas que potencien la transducción. Se puede mostrar en la superficie del lentivirus un anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra un componente de un receptor de células T, como el CD3, para dirigir el virus hacia las células T. La presentación en la superficie de uno o más ligandos para el CD28, una molécula expresada por las células T, puede provocar la activación de estas, lo que las hace más susceptibles a la transducción. Los ligandos para el CD28 pueden incluir, por ejemplo, el CD80 y el CD86.

[0005] Actualmente, los pacientes con neoplasias malignas agresivas de células B que no han respondido a los tratamientos estándar, como la quimioterapia y, a menudo, el trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH), tienen la opción de recibir un producto de células CAR-T autólogas que redirige sus células T contra el antígeno CD 19 mediante un proceso de fabricación ex vivo. Sin embargo, la fabricación de estos productos requiere una serie de pasos complejos, que comienzan con la recolección de células mononucleares de sangre periférica del paciente mediante un procedimiento de leucoaféresis, seguido de la modificación genética de las células T del paciente en una instalación cGMP, lo que introduce retrasos, riesgos y una logística compleja en la atención al paciente. A continuación, se administra quimioterapia de linfodepleción antes de la infusión del producto farmacéutico final. Existe una necesidad médica no cubierta para los pacientes con neoplasias malignas de células B recidivantes/refractarias, tanto en lo que respecta a su enfermedad no tratada como a la imposibilidad de fabricar o tolerar los plazos logísticos de los nuevos productos celulares.

[0006] La presente divulgación proporciona composiciones y métodos relacionados con la transducción in vivo de células inmunitarias para tratar el cáncer y/o las neoplasias malignas de células B.

SÍNTESIS

[0007] La presente divulgación se refiere, en parte, al reconocimiento por parte de los inventores actuales de que, mediante la ingeniería de una partícula utilizada como vehículo de administración para mostrar una molécula de adhesión en su superficie, se puede mejorar la transducción de las células diana (como las células T) por la partícula, lo que da lugar a la generación in vivo de células T que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR). En un aspecto, la presente divulgación proporciona una partícula viral que comprende un genoma vector que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, en donde la partícula viral transduce células inmunitarias in vivo.

[0008] Los inventores actuales han reconocido además que las partículas modificadas que comprenden un polinucleótido que codifica una carga útil, como un CAR, pueden

mejorarse fusionando una molécula de adhesión con una molécula coestimuladora, una molécula de activación o ambas.

[0009] En consecuencia, en un aspecto, la divulgación proporciona una partícula lentiviral para la transducción de células diana, que comprende, mostrada en la superficie de la partícula lentiviral, una molécula de fusión que comprende una molécula de adhesión unida a una molécula coestimuladora, una molécula de activación o ambas. La partícula puede ser una partícula viral, como una partícula lentiviral. La molécula de adhesión, la molécula coestimuladora y la molécula de activación pueden ser proteínas y pueden fusionarse colectivamente en una (o más) proteínas de fusión. En un aspecto, la presente divulgación proporciona una partícula lentiviral que comprende un constructo policistónico que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un receptor de antígeno quimérico anti-CD19.

[0010] En otros aspectos, la divulgación proporciona usos ex vivo e in vivo de las partículas lentivirales (como para la fabricación de células y tratamientos médicos), composiciones farmacéuticas y kits, así como métodos para fabricar las partículas, los polinucleótidos y las células huéspedes.

[0011] En algunas formas de realización, la molécula de adhesión comprende CD58, un dominio extracelular de CD58 o un fragmento funcional de CD58; opcionalmente, en donde la molécula de fusión comprende un dominio extracelular de CD58 o un fragmento funcional del mismo, un dominio extracelular de CD80 o CD86 o un fragmento funcional del mismo, y un dominio de activación, por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-CD3.

[0012] En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona una partícula lentiviral que comprende, mostrada en la superficie de la partícula: una molécula de fusión que comprende:

- a) un dominio extracelular CD58, o un fragmento funcional del mismo,
- b) un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD3, y
- c) un dominio extracelular CD80 o CD86, o un fragmento funcional del mismo.

[0013] En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona una partícula lentiviral que comprende, mostrada en la superficie de la partícula: una molécula de fusión que comprende:

- a) un dominio extracelular CD58, o un fragmento funcional del mismo,
- b) un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD3, y
- c) un dominio extracelular CD80, o un fragmento funcional del mismo.

[0014] En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona una partícula lentiviral que comprende, mostrada en la superficie de la partícula: una molécula de fusión que comprende:

- a) un dominio extracelular CD58, o un fragmento funcional del mismo,
- b) un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD3, y
- c) un dominio extracelular CD86, o un fragmento funcional del mismo.

[0015] En todas estas formas de realización, la partícula lentiviral puede comprender además una glicoproteína viral (proteína G). En una forma de realización ejemplar, la presente divulgación proporciona una partícula lentiviral que comprende, mostrada en la superficie de la partícula:

- (1) una molécula de fusión que comprende:
 - a) un dominio extracelular CD58, o un fragmento funcional del mismo,
 - b) un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-CD3, y
 - c) un dominio extracelular CD80, o un fragmento funcional del mismo; y
- (2) una glicoproteína viral.

[0016] En una forma de realización ejemplar, la presente divulgación proporciona una partícula lentiviral que comprende, mostrada en la superficie de la partícula:

- (1) una molécula de fusión que comprende:
 - a) un dominio extracelular CD58, o un fragmento funcional del mismo,
 - b) un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-CD3, y
 - c) un dominio extracelular CD86, o un fragmento funcional del mismo; y
- (2) una glicoproteína viral. En algunas formas de realización, la proteína G es una glicoproteína coccal.

[0017] En algunas formas de realización, la proteína G es una proteína VSV-G. En formas de realización adicionales, la partícula lentiviral puede comprender además una carga útil que comprende un polinucleótido que codifica una proteína, tal como un receptor de antígeno quimérico.

[0018] La presente divulgación proporciona una partícula lentiviral que comprende, mostrada en la superficie de la partícula: una molécula de fusión que comprende:

- a) un dominio extracelular CD58, o un fragmento funcional del mismo,
- b) un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-CD3,
- c) un dominio extracelular CD80 o CD86, o un fragmento funcional del mismo; y

una glicoproteína viral (proteína G), en donde la partícula lentiviral comprende un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD19.

[0019] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polinucleótido que codifica una unión libre FKBP12-rapamicina (FRB).

[0020] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de cadena gamma de citoquina sintética y un polipéptido de cadena beta de citoquina sintética.

[0021] En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de unión a ligando que comprende un dominio scFv, en donde el scFv comprende además un VL que comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 206 y un VH que comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 208.

[0022] En algunas formas de realización, el scFv comprende un espaciador que comprende una secuencia polipeptídica al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 207.

[0023] En algunas formas de realización, el espaciador scFv comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 207.

[0024] En algunas formas de realización, el scFv comprende una secuencia polipeptídica al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 195.

[0025] En algunas formas de realización, el scFv comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 195.

[0026] En algunas formas de realización, el scFv está codificado por una secuencia polinucleotídica al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 194.

[0027] En algunas formas de realización, el scFv está codificado por la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 194.

[0028] En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de bisagra CD8.

[0029] En algunas formas de realización, el dominio bisagra CD8 está codificado por una secuencia polinucleotídica al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 196.

[0030] En algunas formas de realización, el dominio bisagra CD8 está codificado por la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 196.

[0031] En algunas formas de realización, el dominio bisagra CD8 comprende una secuencia polipeptídica al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 197.

[0032] En algunas formas de realización, el dominio bisagra CD8 comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 197.

[0033] En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio transmembrana CD28.

[0034] En algunas formas de realización, el dominio transmembrana CD28 está codificado por una secuencia polinucleotídica al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92

%, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 198.

[0035] En algunas formas de realización, el dominio transmembrana CD28 está codificado por la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 198.

[0036] En algunas formas de realización, el dominio transmembrana CD28 comprende una secuencia polipeptídica al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 199.

[0037] En algunas formas de realización, el dominio transmembrana CD28 comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 199.

[0038] En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico comprende un endodominio 4-1BB.

[0039] En algunas formas de realización, el endodominio 4-1BB está codificado por una secuencia polinucleotídica al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 200.

[0040] En algunas formas de realización, el endodominio 4-1BB está codificado por la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 200.

[0041] En algunas formas de realización, el endodominio 4-1BB comprende una secuencia polipeptídica al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 201.

[0042] En algunas formas de realización, el endodominio 4-1BB comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 201.

[0043] En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico comprende un endodominio CD3ζ.

[0044] En algunas formas de realización, el endodominio CD3ζ está codificado por una secuencia polinucleotídica al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 202.

[0045] En algunas formas de realización, el endodominio CD3ζ está codificado por la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 202.

[0046] En algunas formas de realización, el endodominio CD3ζ comprende una secuencia polipeptídica al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 203.

[0047] En algunas formas de realización, el endodominio CD3ζ comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 203.

[0048] En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico comprende una secuencia de polinucleótidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 204.

[0049] En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 204.

[0050] En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico comprende una secuencia polipeptídica al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 205.

[0051] En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 205.

[0052] En algunas formas de realización, el dominio extracelular CD58, o un fragmento funcional del mismo, comprende una secuencia polipeptídica que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 10.

[0053] En algunas formas de realización, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD3 es un dominio scFv que comprende una secuencia polipeptídica que es al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 31.

[0054] La partícula lentiviral de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, en donde el dominio extracelular CD80, o un fragmento funcional del mismo, comprende una secuencia polipeptídica que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 12.

[0055] En algunas formas de realización, el dominio extracelular CD86, o un fragmento funcional del mismo, comprende una secuencia polipeptídica que es al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 13.

[0056] En algunas formas de realización, la molécula de fusión comprende, en orden N-terminal a C-terminal, el dominio extracelular CD58, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD3 y el dominio extracelular CD86.

[0057] En algunas formas de realización, la molécula de fusión comprende una secuencia polipeptídica que es al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 33.

[0058] En algunas formas de realización, la molécula de fusión comprende, en orden N-terminal a C-terminal, el dominio extracelular CD58, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD3 y el dominio extracelular CD80.

[0059] En algunas formas de realización, la glicoproteína viral (proteína G) comprende una secuencia polipeptídica que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 34.

94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 74.

[0060] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un constructo policistrónico que comprende, en orden de 5' a 3':

- a. un primer casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la FRB libre,
- b. un segundo casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la cadena gamma de la citoquina sintética,
- c. un tercer casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la cadena beta de la citoquina sintética, y
- d. un cuarto casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico (CAR); en donde cada uno de los casetes de expresión están separados por una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de sitio de escisión.

[0061] En algunas formas de realización, la secuencia polinucleotídica que codifica FRB es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de las SEQ ID NO: 256, 257 o 258.

[0062] En algunas formas de realización, la secuencia polinucleotídica que codifica el FRB libre comprende la secuencia polinucleotídica de las SEQ ID NO: 256, 257 o 258.

[0063] En algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótidos FRB libre codifica una secuencia de polipéptidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de polinucleótidos de las SEQ ID NO: 251, 252 o 260.

[0064] En algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótidos FRB codifica la secuencia de polipéptidos de las SEQ ID NO: 251, 252 o 260.

[0065] En algunas formas de realización, la secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de cadena gamma de citoquina sintética es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de las SEQ ID NO: 261, 262 o 263.

[0066] En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica el polipéptido de cadena gamma de citoquina sintética comprende la secuencia polinucleotídica de las SEQ ID NO: 261, 262 o 263.

[0067] En algunas formas de realización, el polipéptido de la cadena gamma de la citoquina sintética comprende la subunidad γ y del receptor de interleuquina 2 (IL2RG) que comprende una secuencia polipeptídica al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de las SEQ ID NO: 261, 262 o 263.

94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 264 o 265.

[0068] En algunas formas de realización, el IL2RG comprende la secuencia polipeptídica de las SEQ ID NO: 264 o 265.

[0069] En algunas formas de realización, el segundo casete de expresión comprende una secuencia polinucleotídica al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 266.

[0070] En algunas formas de realización, el segundo casete de expresión comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 266.

[0071] En algunas formas de realización, el segundo casete de expresión codifica una secuencia polipeptídica al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 267.

[0072] En algunas formas de realización, el segundo casete de expresión codifica una secuencia polipeptídica que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 267.

[0073] En algunas formas de realización, el segundo casete de expresión comprende además una secuencia de polinucleótidos que codifica FKBP12 que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 268 o 269.

[0074] En algunas formas de realización, la secuencia polinucleotídica que codifica FKBP12 comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 268 o 269.

[0075] En algunas formas de realización, el FKBP12 comprende una secuencia polipeptídica al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de la SEQ ID NO: 253

[0076] En algunas formas de realización, el FKBP12 comprende la secuencia polipeptídica de la SEQ ID NO: 253.

[0077] En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica el polipéptido de la cadena beta de la citoquina sintética es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 270 o 271.

[0078] En algunas formas de realización, en las que el polinucleótido que codifica el polipéptido de la cadena beta de la citoquina sintética comprende la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 270 o 271.

[0079] En algunas formas de realización, el polipéptido de la cadena beta de la citoquina sintética comprende la subunidad β del receptor de interleuquina 2 (IL2RB) que comprende una secuencia polipeptídica al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 272 o 273.

[0080] En algunas formas de realización, el IL2RB comprende la secuencia de polipéptidos de las SEQ ID NO: 272 o 273.

[0081] En algunas formas de realización, el tercer casete de expresión comprende además una secuencia de polinucleótidos que codifica FKBP12 que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 274.

[0082] En algunas formas de realización, la secuencia polinucleotídica que codifica FKBP12 comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 274.

[0083] En algunas formas de realización, el FKBP12 comprende una secuencia polipeptídica al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 275.

[0084] En algunas formas de realización, el FKBP12 comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 275.

[0085] En algunas formas de realización, el tercer casete de expresión comprende una secuencia de polinucleótidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 276.

[0086] En algunas formas de realización, el tercer casete de expresión comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 276.

[0087] En algunas formas de realización, el tercer casete de expresión codifica una secuencia polipeptídica al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 277.

[0088] En algunas formas de realización, el tercer casete de expresión codifica la secuencia polipeptídica que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 277.

[0089] La presente divulgación proporciona un método para tratar un cáncer CD19+ en un sujeto que lo necesita, el método comprende administrar al sujeto la partícula lentiviral de cualquier reivindicación anterior.

[0090] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral se administra por inyección intranodal, intravenosa o subcutánea.

[0091] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral se administra por inyección intranodal a través de un ganglio linfático inguinal.

[0092] La presente divulgación proporciona un método para tratar un cáncer CD19+ en un sujeto que lo necesita, el método comprende proporcionar células inmunitarias de un sujeto, poner en contacto las células inmunitarias de un sujeto mediante incubación extracorpórea con una partícula lentiviral de la presente divulgación y administrar la célula inmunitaria al sujeto mediante transfusión.

[0093] En algunas formas de realización, el sujeto padece o está en riesgo de padecer una neoplasia maligna de células B, una neoplasia maligna recidivante/refractaria que expresa CD19, un linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), un linfoma de células B grandes de tipo Burkitt (B-LBL), un linfoma folicular (FL), una leucemia linfocítica crónica (CLL), una leucemia linfocítica aguda (ALL), un linfoma de células del manto (MCL), malignidad hematológica, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de piel, melanoma, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, carcinoma de células escamosas, leucemia, mieloma, linfoma de células B, cáncer de riñón, cáncer de útero, adenocarcinoma, cáncer de páncreas, leucemia mielógena crónica, glioblastoma, neuroblastoma, meduloblastoma o sarcoma.

[0094] En algunas formas de realización, el método comprende la administración de un ligando no fisiológico.

[0095] En algunas formas de realización, el ligando no fisiológico comprende rapamicina o un análogo de rapamicina.

[0096] La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula lentiviral de la presente divulgación y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0097] La presente divulgación proporciona una partícula lentiviral que comprende, mostrada en la superficie de la partícula: una molécula de fusión que comprende

- a) un dominio extracelular CD58, o un fragmento funcional del mismo,
- b) un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-CD3, y
- c) un dominio extracelular CD80, o un fragmento funcional del mismo; y una glicoproteína viral (proteína G); en donde la partícula lentiviral comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD19, un FRB libre, un polipéptido de cadena gamma de citoquina sintética y un polipéptido de cadena beta de citoquina sintética, en donde el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de unión a ligando que comprende un scFv, un dominio bisagra, un dominio transmembrana, un endodominio 41BB y un endodominio CD3 ζ , y en donde el scFv comprende un VL que comprende SEQ ID NO: 206 y un VH que comprende SEQ ID NO: 208, el dominio bisagra comprende SEQ ID NO: 197, el dominio transmembrana comprende SEQ ID NO: 199, el endodominio 41BB comprende SEQ ID NO: 201 y el endodominio CD3 ζ comprende SEQ ID NO: 203.

[0098] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un constructo policistrónico que comprende, en orden de 5' a 3':

- a. un primer casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la FRB libre,

- b. un segundo casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la cadena gamma de la citoquina sintética,
- c. un tercer casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la cadena beta de la citoquina sintética, y
- d. un cuarto casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde cada uno de los casetes de expresión están separados por una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de sitio de escisión.

[0099] En algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótidos que codifica FRB es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de las SEQ ID NO: 256, 257 o 258.

[0100] En algunas formas de realización, la secuencia polinucleotídica FRB libre codifica una secuencia polipeptídica que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de las SEQ ID NO: 251, 252 o 260.

[0101] En algunas formas de realización, la secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de cadena gamma de citoquina sintética es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de las SEQ ID NO: 261, 262 o 263.

[0102] En algunas formas de realización, el polipéptido de cadena gamma de citoquina sintética comprende la subunidad γ del receptor de interleuquina 2 (IL2RG) que comprende una secuencia polipeptídica al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 264 o 265.

[0103] En algunas formas de realización, el segundo casete de expresión comprende una secuencia de polinucleótidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 266.

[0104] En algunas formas de realización, el segundo casete de expresión codifica una secuencia polipeptídica al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 267.

[0105] En algunas formas de realización, el segundo casete de expresión comprende además una secuencia de polinucleótidos que codifica FKBP12 que es al menos un 80

%, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 268 o 269.

[0106] En algunas formas de realización, el FKBP12 comprende una secuencia polipeptídica al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 253

[0107] En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica el polipéptido de la cadena beta de la citoquina sintética es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 270 o 271.

[0108] En algunas formas de realización, el polipéptido de la cadena beta de la citoquina sintética comprende la subunidad β del receptor de interleuquina 2 (IL2RB) que comprende una secuencia polipeptídica al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 272 o 273.

[0109] En algunas formas de realización, el tercer casete de expresión comprende además una secuencia de polinucleótidos que codifica FKBP12 que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 274.

[0110] En algunas formas de realización, el FKBP12 comprende una secuencia polipeptídica al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 275.

[0111] En algunas formas de realización, el tercer casete de expresión comprende una secuencia polinucleotídica al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 276.

[0112] En algunas formas de realización, el tercer casete de expresión codifica una secuencia polipeptídica al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 277.

[0113] En algunas formas de realización, la molécula de fusión comprende una secuencia polipeptídica al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 72.

[0114] En algunas formas de realización, la molécula de fusión comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 72.

[0115] En algunas formas de realización, la molécula de fusión comprende, en orden de 5' a 3':

- a. un dominio extracelular CD58, o un fragmento funcional del mismo,

- b. un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD3, y
- c. un dominio extracelular CD80, o un fragmento funcional del mismo.

[0116] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un constructo policistrónico que comprende, en orden de 5' a 3':

- a. un primer casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la FRB libre,
- b. un segundo casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la cadena gamma de la citoquina sintética,
- c. un tercer casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la cadena beta de la citoquina sintética, y
- d. un cuarto casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico (CAR); en donde el CAR se une específicamente al CD19.

[0117] En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de unión a ligando que comprende un scFv que comprende un VL que comprende la SEQ ID NO: 206 o secuencias al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a esta, y un VH que comprende la SEQ ID NO: 208 o secuencias al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a esta.

[0118] En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de bisagra que comprende SEQ ID NO: 197 o secuencias al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la misma.

[0119] En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio transmembrana que comprende la SEQ ID NO: 199 o secuencias al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la misma.

[0120] En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio endodominio 41BB que comprende la SEQ ID NO: 201 o secuencias al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la misma.

[0121] En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico comprende un endodominio CD3ζ que comprende la SEQ ID NO: 203 o secuencias al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la misma.

[0122] En algunas formas de realización, el cuarto casete de expresión codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 205 o secuencias al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la misma.

[0123] La presente divulgación proporciona una partícula lentiviral que comprende, mostrada en la superficie de la partícula: una molécula de fusión que comprende

- a) un dominio extracelular CD58, o un fragmento funcional del mismo,
- b) un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD3, y
- c) un dominio extracelular CD80, o un fragmento funcional del mismo; y

una glicoproteína viral (proteína G); en donde la partícula lentiviral comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente al CD19, en donde el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de unión al ligando que comprende un scFv, un dominio bisagra, un dominio transmembrana, un endodominio 41BB y un endodominio CD3ζ, y en donde el scFv comprende un VL que comprende SEQ ID NO: 206 y un VH que comprende SEQ ID NO: 208, el dominio bisagra comprende SEQ ID NO: 197, el dominio transmembrana comprende SEQ ID NO: 199, el endodominio 41BB comprende la SEQ ID NO: 201 y el endodominio CD3ζ comprende la SEQ ID NO: 203.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0124] La FIG. 1A muestra un esquema de una forma de realización de la presente divulgación en donde una partícula lentiviral se modifica con una molécula de fusión y una glicoproteína en su superficie y la partícula comprende una carga útil que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-CD19. En la forma de realización representada, el CAR comprende un dominio de unión de fragmento de anticuerpo de cadena única anti-CD19, un dominio de bisagra, un dominio transmembrana derivado de CD28 y dominios de señalización intracelular 41BB y CD3z.

[0125] La FIG. 1B representa la activación de células T por una partícula lentiviral que presenta un fragmento variable de cadena única específico para CD3, una proteína de la envoltura viral (Cocal G) y dos moléculas coestimuladoras.

[0126] La FIG. 2A muestra la activación de las células T CD8+ medida por el porcentaje de células CD25+ con una partícula lentiviral que presenta CD3scfv o CD3scfv+CD80.

[0127] La FIG. 2B muestra la activación de las células T CD8+ medida por el porcentaje de células CD25+ con una partícula lentiviral que presenta solo CD3scfv, CD3scfv+CD80 o CD3scfv+CD58.

[0128] Las FIG. 2C-2D muestran los niveles de expresión de CAR en células T CD8+, determinados por la expresión de %CAR (FIG. 2C) o el total de células T CD8+ CAR+ (FIG. 2D) generadas utilizando partículas lentivirales con solo CD3scfv o CD3scfv+CD80.

[0129] Las FIG. 2E-2F muestran los niveles de expresión de CAR en células T CD3+, determinados por el porcentaje de expresión de CAR (Figura 2E) o el total de células T CAR+ CD3+ (Figura 2F) generadas utilizando partículas lentivirales con CD3scfv solo, CD3scfv+CD80 o CD3scfv+CD58.

[0130] Las FIG. 2G-2H muestran la expansión múltiple de las células T CAR+CD8+ generadas con partículas lentivirales con CD3scfv solo o CD3scfv+CD80 estimuladas con IL-2 (FIG. 2G) o rapamicina (FIG. 2H).

[0131] La FIG. 3A muestra los porcentajes de células T CD8 CD25(+) tras la incubación con una partícula lentiviral que expresa solo CD3scfv, CD3scfv+CD80, CD3scfv+CD58 o CD3scfv+CD80+CD58.

[0132] La FIG. 3B muestra la intensidad fluorescente media geométrica (gMFI) de las células T CD25(+) CD8 tras la incubación con una partícula lentiviral que presenta solo CD3scfv, CD3scfv+CD80, CD3scfv+CD58 o CD3scfv+CD80+CD58.

[0133] Las FIG. 3C-3E muestran la producción de citoquinas 3 días después de la incubación con partículas que expresan solo CD3scfv, CD3scfv+CD80, CD3scfv+CD58 o CD3scfv+CD80+CD58. Se midieron los niveles de IFN- γ (FIG. 3C), IL-2 (FIG. 3D) y TNF- α (FIG. 3E).

[0134] Las FIG. 3F-3G muestran la expresión de CAR en células T CD3+ generadas con partículas lentivirales que expresan solo CD3scfv, CD3scfv+CD80, CD3scfv+CD58 o CD3scfv+CD80+CD58 (partículas mixtas). Se midieron el porcentaje (%) de expresión de CAR (FIG. 3F) y el total de células T CAR+ (FIG. 3G).

[0135] Las FIG. 3H-3I muestran la expresión de CAR en células T CD8+ generadas con partículas lentivirales que expresan solo CD3scfv, CD3scfv+CD80, CD3scfv+CD58 o CD3scfv+CD80+CD58 (misma partícula). Se midieron el porcentaje (%) de expresión de CAR (FIG. 3H) y el total de células T CAR+ (FIG. 3I).

[0136] Las FIG. 3J-3L muestran la tinción de Cocal (FIG. 3J), CD80 (FIG. 3K) o CD58 (FIG. 3L) en células T CD8+ incubadas con partículas lentivirales que expresan solo CD3scfv, CD3scfv+CD80, CD3scfv+CD58 o CD3scfv+CD80+CD58.

[0137] La FIG. 3M muestra un análisis de componentes principales con tres grupos principales de diferenciación basados en la composición de moléculas coestimuladoras de partículas utilizando marcadores CCR7, CD45RO, CD45RA, CD27, CD25, CAR+, CD4 y CD8 y el total de células.

[0138] La FIG. 3N muestra que las partículas CD3scfv+CD80 generan células T CAR+ con un fenotipo predominantemente de memoria central (T_{cm}) en comparación con las partículas CD3scfv solas, que produjeron células T efectoras (T_{eff}).

[0139] La FIG. 3O muestra que las partículas CD3scfv+CD80, CD3scfv+CD58 o CD3scfv+CD80+CD58 generan células T CAR+ con un fenotipo predominantemente de

memoria central (T_{cm}) en comparación con las partículas CD3scfv solas, que produjeron células T efectoras (T_{eff}) y células T de memoria central (T_{cm}).

[0140] La FIG. 4A muestra el número de células K562.CD19 durante varios días después de la incubación con células T CAR+ anti-CD19 generadas con partículas lentivirales que codifican un CAR anti-CD19 y que muestran solo CD3scfv, CD3scfv+CD80, CD3scfv+CD58 o CD3scfv+CD80+CD58. Las partículas se añadieron a las PBMC con un MOI de 10 junto con células tumorales en una proporción PBMC:tumor de 5:1 y se colocaron directamente en el sistema de imagen de células vivas Incucyte®. Las células T CAR CD3scfv+CD80+CD58 se generaron utilizando una mezcla de partículas individuales.

[0141] La FIG. 4B muestra el número de células Raji durante varios días tras la incubación con células T CAR+ anti-CD19 generadas con partículas lentivirales que codifican un CAR anti-CD19 y que presentan partículas CD3scfv solo, CD3scfv+CD80, CD3scfv+CD58 o CD3scfv+CD80+CD58. Las partículas se añadieron a las PBMC con un MOI de 10 junto con células tumorales en una proporción PBMC:tumor de 5:1 y se colocaron directamente en el IncuCyte. Las células T CAR CD3scfv+CD80+CD58 se generaron utilizando una mezcla de partículas individuales.

[0142] La FIG. 4C muestra el número de células K562.CD19 durante varios días tras la incubación con células T CAR+ anti-CD19 generadas con partículas lentivirales que codifican un CAR anti-CD19 y que presentan partículas CD3scfv solo, CD3scfv+CD80, CD3scfv+CD58 o CD3scfv+CD80+CD58. Siete días después de la transducción a un MOI de 10, se calcularon las células CAR+ totales y se incubaron con K562.CD19 en proporciones E:T de 0,5 y 1, respectivamente. Las células T CAR CD3scfv+CD80+CD58 se generaron utilizando una mezcla de partículas individuales.

[0143] La FIG. 4D muestra el número de células Raji durante varios días tras la incubación con células T CAR+ anti-CD19 generadas con partículas lentivirales que codifican un CAR anti-CD19 y que expresan solo CD3scfv, CD3scfv+CD80, CD3scfv+CD58 o CD3scfv+CD80+CD58. Siete días después de la transducción con un MOI de 10, se calcularon las células CAR+ totales y se incubaron con células Raji en proporciones E:T de 0,5 y 1, respectivamente. Se generaron células T CAR CD3scfv+CD80+CD58 utilizando una mezcla de partículas individuales.

[0144] La FIG. 4E muestra el número de células K562.CD19 durante varios días tras la incubación con células T CAR+ anti-CD19 generadas con partículas lentivirales que codifican un CAR anti-CD19 y que presentan partículas CD3scfv, CD3scfv+CD80, CD3scfv+CD58 o CD3scfv+CD80+CD58. Siete días después de la transducción a un MOI de 10, se calcularon las células CAR+ totales y se incubaron con células K562.CD19 en proporciones E:T de 1:1, respectivamente. Las células T CAR

CD3scfv+CD80+CD58 se generaron utilizando una sola partícula con moléculas coestimuladoras y de adhesión.

[0145] La FIG. 4F muestra el número de células Nalm6 durante varios días tras la incubación con células T CAR⁺ anti-CD19 generadas con partículas lentivirales que codifican un CAR anti-CD19 y que expresan solo CD3scfv, CD3scfv+CD80, CD3scfv+CD58 o partículas CD3scfv+CD80+CD58. Siete días después de la transducción a un MOI de 10, se calcularon las células CAR⁺ totales y se incubaron con células Nalm6 en proporciones E:T de 1:1, respectivamente. Las células T CAR CD3scfv+CD80+CD58 se generaron utilizando una sola partícula con moléculas coestimuladoras y de adhesión. Las FIG. 4A-4F están etiquetadas con una leyenda a la derecha de cada gráfico con etiquetas que corresponden (en orden) al extremo derecho de cada línea del gráfico.

[0146] La FIG. 5A muestra el número de células CAR T en muestras de sangre de ratones NSG MHCII KO 11 días después de la inyección de PMBC y partículas lentivirales que expresan solo CD3scfv o partículas CD3scfv+CD80.

[0147] Las FIG. 5B-5C muestran la carga tumoral en ratones NSG MHCII KO durante 100 días después de la administración de partículas lentivirales que expresan solo CD3scfv (FIG. 5B) o CD3scfv+CD80 (FIG. 5C).

[0148] Las FIG. 6A-6B muestran el número de células que expresan un CAR 3 días (FIG. 6A) o 7 días (FIG. 6B) después de la transducción de PBMC de tres donantes sanos con partículas lentivirales que expresan solo CD3scfv o partículas CD3scfv+CD80+CD58.

[0149] Las FIG. 7A-7C muestran la expresión de CAR en células transducidas con partículas lentivirales pseudotipificadas con proteínas de envoltura VSV-G mutantes. Se cultivaron células SupT1 (FIG. 7A) o PBMC de dos donantes sanos (FIG. 7B-7C) con partículas lentivirales que tenían una carga útil CAR anti-CD19 y presentaban proteínas de envoltura VSV-G mutantes con o sin CD3scfv+CD80+CD58. Se evaluó la expresión de CAR en células T CD4⁺ (FIG. 7B) y células T CD8⁺ (FIG. 7C) tras la transducción de las PBMC.

[0150] La FIG. 8 muestra el número de células T CAR negativas en la sangre de ratones tras la administración de partículas en las dosis indicadas que codifican un CAR anti-CD19 y que expresan solo CD3scfv o CD3scfv+CD80+CD58.

[0151] La FIG. 9A es un esquema que muestra una proteína de fusión ilustrativa que comprende una región extracelular CD58 y α -CD3 scFv fusionada al extremo N-terminal de un CD80 a través de un enlazador. El constructo se denomina "498".

[0152] La FIG. 9B es un esquema que muestra una proteína de fusión ilustrativa que comprende una región extracelular CD58 fusionada al extremo N-terminal de un CD80 a

través de un enlazador. El constructo se denomina “455”. El α -CD3 scFv se expresa como un polipéptido separado en las células productoras.

[0153] La FIG. 10 muestra la tinción de Cocal en células T CD8+ generadas con partículas lentivirales que expresan α -CD3 scFv, CD80 y CD58, que fueron expresadas por las células productoras de partículas lentivirales como polipéptidos separados (“Separados”); partículas lentivirales que expresan α -CD3 scFv, CD80 y CD58 expresadas por las células productoras de partículas lentivirales como polipéptido de fusión que comprende CD58 fusionado con CD80, con α -CD3 scFv expresado como un polipéptido separado (“455”); y partículas lentivirales que expresan una proteína de fusión que compara CD58, α -CD3 scFv y CD80 (“498”), o control sin partículas lentivirales (“MOI 0”).

[0154] La FIG. 11A muestra el porcentaje de células T CD25(+) CD4+ tras la incubación con partículas lentivirales, etiquetadas como en la FIG. 10.

[0155] La FIG. 11B muestra el porcentaje de células T CD25(+) CD8+ tras la incubación con partículas lentivirales, etiquetadas como en la FIG. 10.

[0156] La FIG. 11C muestra la intensidad fluorescente media geométrica (gMFI) de las células T CD25(+) CD4+ tras la incubación con partículas lentivirales, etiquetadas como en la FIG. 10.

[0157] La FIG. 11D muestra la intensidad fluorescente media geométrica (gMFI) de las células T CD25(+) CD8+ tras la incubación con partículas lentivirales, etiquetadas como en la FIG. 10.

[0158] Las FIG. 12A-12C muestran la producción de citoquinas 3 días después de la incubación con partículas lentivirales, etiquetadas como en la FIG. 10. Se midieron los niveles de IFN- γ (FIG. 12A), IL-2 (FIG. 12B) y TNF- α (FIG. 12C). Las partículas comprendían una carga útil anti-CD19-FRB-RACR. FRB = dominio de unión al complejo FKBP-rapamicina; RACR = receptor de superficie celular activado por rapamicina.

[0159] Las FIG. 13A-13D muestran que las partículas que expresan “#498” que muestran partículas que generan células CAR+ T con una mayor proporción de células CAR T CD4+ similares a las de memoria, células CAR T que expresan el marcador de senescencia CD57 (FIG. 13A y FIG. 13B) o células CAR T CD8+ similares a las de memoria (FIG. 13C y FIG. 13D) en comparación con las partículas que muestran “#455” o “Separadas”.

[0160] La FIG. 14A es un esquema que muestra una cronología experimental ilustrativa.

[0161] La FIG. 14B muestra el porcentaje de células T CD25(+) CD3+ en sangre tras la incubación con partículas lentivirales, etiquetadas como en la FIG. 10.

[0162] La FIG. 14C muestra el porcentaje de células T CD71(+) CD3+ en sangre tras la incubación con partículas lentivirales, etiquetadas como en la FIG. 10.

[0163] La FIG. 14D muestra el nivel de citoquina IFN- γ medido 4 días después de la incubación con partículas lentivirales, etiquetadas como en la FIG. 10.

[0164] Las FIG. 15A-15C es un panel de gráficos que muestra la intensidad fluorescente media geométrica (gMFI) de Cocal en células generadas con partículas lentivirales mediante incubación extracorpórea in vivo. Las células se tiñeron antes de la incubación con partículas lentivirales “prepartícula”, tras la incubación de las partículas lentivirales con las células pero antes del lavado (“partícula, pre-lavado”), o tras la incubación de las partículas lentivirales con las células y después del lavado (“final”). Las partículas lentivirales que expresan CD58 y CD80 como un polipéptido de fusión se etiquetan como en la FIG. 10. Se evaluó la incubación de partículas lentivirales con células T CD4+, células T CD8+, células T NK, células NK, células NK CD56+, monocitos, células B y otra intensidad fluorescente media (MFI).

[0165] La FIG. 16A muestra células T CAR+ en la sangre de ratones inyectados con PBMC del donante 1, ya sea después del lavado con Lupagen™ o después de la incubación con partículas lentivirales marcadas como en la FIG. 10.

[0166] La FIG. 16B muestra células T CAR+ en la sangre de ratones inyectados con PBMC del donante 2, ya sea después del lavado con Lupagen™ o después de la incubación con partículas lentivirales marcadas como en la FIG. 10.

[0167] La FIG. 16C muestra la carga tumoral total (flujo total) a lo largo de los 21 días del estudio en la sangre de ratones inyectados con PBMC del donante 1, ya sea después del lavado con Lupagen™ o después de la incubación marcada como en la FIG. 10.

[0168] La FIG. 16D muestra la carga tumoral total (flujo total) a lo largo de los 21 días del estudio en la sangre de ratones inyectados con PBMC del donante 2, ya sea después del lavado con Lupagen™ o después de la incubación marcada como en la FIG. 10.

[0169] La FIG. 16E muestra imágenes de bioluminiscencia utilizando el sistema de espectro IVIS™ que representan la carga tumoral total cuantificada en las FIG. 16C y FIG. 16D.

[0170] Las FIG. 17A-17B muestran la expresión de CD25 en células CD4+ (FIG. 17A) transducidas con partículas lentivirales producidas utilizando los plásmidos de superficie indicados que codifican variaciones de la expresión del polipéptido de fusión CD58 y CD80 o la expresión de CD25 en células CD8+ (FIG. 17B).

[0171] La FIG. 17C muestra un gráfico de barras de los efectos de las partículas lentivirales producidas utilizando los plásmidos de superficie indicados. Se cultivaron PBMC humanas no estimuladas y se marcaron como en la FIG. 10. Se analizó mediante citometría de flujo la activación temprana de las células T medida por el nivel de expresión de CD25 en el día 3 tras el cultivo de PBMC. Se incluyen NTC (células no

transducidas) para comparar. Se añadieron partículas lentivirales con una multiplicidad de infección (MOI) de 2 y 5.

[0172] Las FIG. 18A-18B muestran la expresión de CAR en células CD4⁺ (FIG. 18A) transducidas con partículas lentivirales producidas utilizando los plásmidos de superficie indicados que codifican variaciones de la expresión del polipéptido de fusión CD58 y CD80 o la expresión de CD25 en células CD8⁺ (FIG. 18B). La expresión de CAR se midió mediante el nivel de expresión de FMC63 en el día 7 tras el cultivo de PBMC y se analizó mediante citometría de flujo.

[0173] La FIG. 18C muestra un gráfico de barras de los efectos de las partículas lentivirales producidas utilizando los plásmidos de superficie indicados. Se cultivaron PBMC humanas no estimuladas con partículas lentivirales que mostraban variaciones del polipéptido de fusión CD58 y CD80. La expresión de CAR, medida por el nivel de expresión de FMC63 en el día 7 tras el cultivo de PBMC, se analizó mediante citometría de flujo. Se incluyen NTC (células no transducidas) para comparar. Se añadieron partículas lentivirales con una multiplicidad de infección (MOI) de 2 y 5.

[0174] Las FIG. 19A-19D muestran los efectos de las proteínas de superficie lentivirales indicadas sobre la citotoxicidad inducida por CAR-T FMC63 en presencia de células diana Nalm6 marcadas con NucLight™ Red que expresan el antígeno hCD19. Las curvas cinéticas de destrucción de IncuCyte™ para cada variante de CAR-T transducida utilizando lentivirus que muestran variaciones de los polipéptidos de fusión CD58 y CD80 a MOI 2. La FIG. 19A muestra una relación CAR-T/célula diana de 0,25:1. La FIG. 19B muestra las curvas de destrucción cuando la relación CAR-T/célula diana es de 0,5:1. La FIG. 19C muestra las curvas de destrucción cuando la relación CAR-T/célula diana es de 1:1. La FIG. 19D muestra la capacidad lítica de las células CAR-T sobre las células diana integrando el área bajo las curvas de destrucción de células diana normalizadas (AUC) cuando la relación CAR-T/células diana oscila entre 0,25 y 4. Porcentaje (%) de destrucción mediada por CAR específica del antígeno = $(1-(AUC/AUC_{Mock})) \times 100$. La FIG. 20 es un gráfico de barras que muestra la secreción de IFN- γ , IL-2 y TNF α dependiente del objetivo en células CAR-T FMC63, que fueron transducidas con partículas lentivirales que mostraban las variaciones indicadas de polipéptidos de fusión CD58 y CD80 a un MOI de 2. Las células T transducidas se co-cultivaron con células diana Nalm6 en una proporción de células CAR-T a células diana de 1:1. "Simulación" se refiere a las células CAR-T FMC63 cultivadas sin células diana Nalm6; "Solo diana" se refiere a las células Nalm6 cultivadas sin células T.

[0175] Las FIG. 21A-21B muestran la expresión de CD25 en células CD4⁺ (FIG. 21A) transducidas con partículas lentivirales producidas utilizando los plásmidos de superficie

indicados que codifican variaciones de la expresión del polipéptido de fusión CD58 y CD80 o la expresión de CD25 en células CD8⁺ (FIG. 21B).

[0176] La FIG. 21C muestra un gráfico de barras de los efectos de las partículas lentivirales producidas utilizando los plásmidos de superficie indicados. Se cultivaron PBMC humanas no estimuladas con partículas lentivirales que presentaban variaciones del polipéptido de fusión CD58 y CD80. La activación temprana de las células T, medida por el nivel de expresión de CD25 al tercer día tras el cultivo de PBMC, se analizó mediante citometría de flujo. Se incluyen NTC (células no transducidas) para comparar. Se añadieron partículas lentivirales con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,5 y 1.

[0177] Las FIG. 22A-22B muestran la expresión de CAR en células CD4⁺ (FIG. 22A) transducidas con partículas lentivirales producidas utilizando los plásmidos de superficie indicados que codifican variaciones de la expresión del polipéptido de fusión CD58 y CD80 o la expresión de CD25 en células CD8⁺ (FIG. 22B).

[0178] La FIG. 22C muestra un gráfico de barras de los efectos de las partículas lentivirales producidas utilizando los plásmidos de superficie indicados. Se cultivaron PBMC humanas no estimuladas con partículas lentivirales que mostraban variaciones del polipéptido de fusión CD58 y CD80. La expresión de CAR, medida por el nivel de expresión de FMC63 en el día 7 tras el cultivo de PBMC, se analizó mediante citometría de flujo. Se incluyen NTC (células no transducidas) para comparar. Se añadieron partículas de lentivirus con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,5 y 1.

[0179] La FIG. 23 muestra un gráfico de barras de los efectos de las partículas de lentivirus producidas utilizando los plásmidos de superficie indicados. Se cultivaron PBMC humanas no estimuladas con partículas de lentivirus que presentaban variaciones de los polipéptidos de fusión CD58, CD80 y anti-CD3 scFv. Se analizó mediante citometría de flujo la activación temprana de las células T, medida por el nivel de expresión de CD25 en el día 3 tras el cultivo de PBMC. Se incluyen NTC (células no transducidas) para comparar. Se añadieron partículas lentivirales con una multiplicidad de infección (MOI) de 1 y 10.

[0180] La FIG. 24 muestra un gráfico de barras de los efectos de las partículas de lentivirus producidas utilizando los plásmidos de superficie indicados. Se cultivaron PBMC humanas no estimuladas con partículas de lentivirus que presentaban variaciones de CD58, CD80 y polipéptidos de fusión anti-CD3 scFv. La expresión de CAR, medida por el nivel de expresión de FMC63 en el día 7 tras el cultivo de PBMC, se analizó mediante citometría de flujo. Se incluyen NTC (células no transducidas) para comparar. Se añadieron partículas lentivirales con una multiplicidad de infección (MOI) de 1 y 10.

[0181] La FIG. 25 muestra un gráfico de la expansión de células T CAR⁺ durante 11 días tras la transducción. Las células T CAR⁺ se transducían con partículas lentivirales que

presentaban variaciones de polipéptidos de fusión CD58, CD80 y anti-CD3 scFv. El día 3 tras la transducción, las PBMC se lavaban para eliminar las partículas lentivirales y se sembraron en medios de cultivo frescos a 0,5E6 células por pocillo. Las células CAR+ se determinaron mediante tinción para la expresión superficial de anti-FMC63 scFv y se analizaron por citometría de flujo.

[0182] La FIG. 26 es un esquema del enfoque de cribado de polipéptidos de fusión representado en las FIG. 17-25.

[0183] La FIG. 27A muestra diagramas de proteínas de fusión ilustrativas.

[0184] La FIG. 27B muestra diagramas de proteínas de fusión ilustrativas. El enlazador de 21 aa puede tener la secuencia polipeptídica GSSGSGSGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 34). El enlazador de 23 aa puede tener la secuencia polipeptídica GSSGSGSGGGSGGGGSGGGGSSG (SEQ ID NO: 35).

[0185] La FIG. 28A muestra el diseño y el calendario del estudio.

[0186] La FIG. 28B es un gráfico que muestra la tinción de Cocal en células T CD3+ incubadas con partículas modificadas que expresan CD58, CD80 y polipéptido de trifusión anti-CD3 scFv.

[0187] FIG. 28C es un gráfico que muestra la tinción de Cocal en células T unidas a partículas modificadas. El pico izquierdo muestra las células T CD3- y el pico derecho muestra las células T CD3+. Las partículas modificadas muestran un polipéptido de triple fusión CD58, CD80 y anti-CD3 scFv “partícula modificada”.

[0188] La FIG. 28D muestra la expresión de CD25 en células T CD8+ al tercer día tras la transducción con partículas lentivirales que expresan CD58, CD80 y el polipéptido de trifusión anti-CD3 scFv “partícula modificada”.

[0189] La FIG. 28E muestra la expresión de CAR en células T CD8+ el día 7 tras la transducción con partículas lentivirales que expresan CD58, CD80 y el polipéptido de triple fusión anti-CD3 scFv “partícula modificada”.

[0190] La FIG. 29 muestra el número de células Nalm6 después de que las células T CAR+ anti-CD19 fueran estimuladas en serie con células tumorales Nalm6 cada 2-3 días. Las células T CAR+ anti-CD19 se generaron con partículas lentivirales que codifican un transgén CAR anti-CD19 y que expresan partículas polipeptídicas de triple fusión CD3scfv-CD80-CD58 “partícula modificada”. Las flechas indican la estimulación con células tumorales Nalm6. Las barras de error indican la media $\pm$ SEM.

[0191] La FIG. 30A muestra el diseño y el calendario del estudio. La FIG. 30B muestra el número de células que expresan el marcador de activación CD25 en circulación cuatro días después de la transducción con partículas lentivirales que expresan el polipéptido de triple fusión CD3scfv-CD80-CD58. La FIG. 30C muestra el número de células que expresan el marcador de activación CD71 en circulación cuatro días después de la

transducción con partículas lentivirales que expresan el polipéptido de trifusión CD3scfv-CD80-CD58. La FIG. 30D muestra la producción de IFN- γ cuatro días después de la incubación con partículas que expresan el polipéptido de trifusión CD3scfv-CD80-CD58 “partícula modificada genéticamente”. La FIG. 30E muestra el número de células T que expresan un CAR anti-CD19 en la sangre 11 días después de la transducción con partículas lentivirales que expresan el polipéptido de triple fusión CD3scfv-CD80-CD58 a una dosis lentiviral de 10 millones o 50 millones de unidades transductoras (TU). La FIG. 30F muestra la carga tumoral en ratones NSG MHCII KO tras la administración de partículas lentivirales que expresan el polipéptido de triple fusión CD3scfv-CD80-CD58 a una dosis lentiviral de 10 millones o 50 millones de unidades transductoras (TU).

[0192] La FIG. 31A muestra el diseño y el calendario del estudio. La FIG. 31B muestra el número de células T del donante 1 y del donante 2 que expresan un CAR anti-CD19 en la sangre 14 días después de la incubación extracorpórea con partículas lentivirales. La FIG. 31C muestra la carga tumoral en ratones NSG MHCII KO del donante 1 y del donante 2 tras la administración de células T producidas mediante incubación extracorpórea con partículas lentivirales. N = 7 animales; las barras de error indican la media $\pm$ SEM. La FIG. 31D muestra el diseño del estudio y el calendario para el estudio de reexposición. La FIG. 31E muestra la carga tumoral en ratones NSG MHCII KO tras la administración de células T producidas mediante incubación extracorpórea de PBMC del donante 1 o del donante 2 incubadas con partículas lentivirales tras la reexposición a células tumorales en el día 49. Las barras de error indican la media $\pm$ SEM.

[0193] La FIG. 32A muestra el diseño del estudio y el calendario. La FIG. 32B muestra el porcentaje de células T CAR⁺ (panel izquierdo) y el total de células T CAR⁺ (panel derecho) en la sangre de ratones inyectados con PBMC del donante 1 tras la incubación de Lupagen™ con partículas lentivirales que expresan α -CD3 scFv, CD80 y CD58, que fueron expresadas por las células productoras de partículas lentivirales como un polipéptido de bifusión que comprende CD58 fusionado con CD80, con α -CD3 scFv expresado como un polipéptido separado (“#455”); y partículas lentivirales que expresan una proteína de trifusión que compara CD58, α -CD3 scFv y CD80 (“#498”), o PBMC de control no incubadas con partículas lentivirales. La FIG. 32C muestra el porcentaje de células T CAR⁺ (panel izquierdo) y el total de células T CAR⁺ (panel derecho) en la sangre de ratones inyectados con PBMC del donante 2 tras la incubación con Lupagen™ con partículas lentivirales que expresaban α -CD3 scFv, CD80 y CD58, que fueron expresadas por las células productoras de partículas lentivirales como un polipéptido de bifusión que comprende CD58 fusionado con CD80, con α -CD3 scFv expresado como un polipéptido separado (“#455”); y partículas lentivirales que expresan una proteína de triple fusión que compara CD58, α -CD3 scFv y CD80 (“#498”), o PBMC de control no

incubadas con partículas lentivirales. La FIG. 32D muestra imágenes de bioluminiscencia obtenidas con el sistema IVIS™ Spectrum que representan la carga tumoral total. Las imágenes muestran ratones inyectados con PBMC del donante 1 tras la incubación con Lupagen™ con partículas lentivirales que muestran “#455”, una fusión doble, o “#498”, una fusión triple (panel izquierdo), y ratones inyectados con PBMC del donante 2 tras la incubación con Lupagen™ con partículas lentivirales que muestran “#455”, una fusión doble, o “#498”, una fusión triple (panel derecho). Las FIG. 32E-32G muestran la carga tumoral total (flujo total) a lo largo de los 45 días del estudio en la sangre de ratones inyectados con PBMC del donante 1 (fila superior de paneles) o del donante 2 (fila inferior de paneles) tras la incubación de Lupagen™ con PBMC no tratadas (FIG. 32E), partículas lentivirales que muestran “#455” una fusión doble (FIG. 32F), o “#498”, una fusión triple (FIG. 32G). Las FIG. 32H-32I muestran la carga tumoral total (flujo total) a lo largo de los 28 días del estudio en la sangre de ratones inyectados con PBMC del donante 1 (FIG. 32H) o del donante 2 (FIG. 32I) tras la incubación de Lupagen™ con PBMC de control no tratadas, partículas lentivirales que muestran “#455” o “#498” un polipéptido de fusión doble o triple, respectivamente.

[0194] La FIG. 33A muestra el diseño y el calendario del estudio de reexposición. La FIG. 33B muestra la carga tumoral en ratones NSG MHCII KO tras la administración de células T producidas mediante incubación extracorpórea de PBMC del donante 1 (D1) o del donante 2 (D2) incubadas con partículas lentivirales que expresan “#455”, un constructo de fusión doble, o “#498”, un constructo de fusión triple, tras la reexposición a las células tumorales en el día 49. La FIG. 33C muestra imágenes de bioluminiscencia obtenidas con el sistema IVIS™ Spectrum que representan la carga tumoral total. Las imágenes muestran ratones inyectados con PBMC del donante 1 tras la incubación con Lupagen™ con partículas lentivirales que expresan “#455”, una fusión dual, o “#498”, una triple fusión (panel izquierdo), y ratones inyectados con PBMC del donante 2 tras la incubación de Lupagen™ con partículas lentivirales que expresan “#455”, una fusión dual, o “#498”, una triple fusión (panel derecho), tras la reexposición a las células tumorales en el día 49.

[0195] Las FIG. 34A-34C incluyen ejemplos de secuencias de triple fusión de CD58, CD80 y CD3 scFv.

[0196] Las FIG. 35A-35C incluyen ejemplos de secuencias de triple fusión de CD58, CD80 y CD3 scFv.

[0197] La FIG. 36 muestra estudios que comparan la función de partículas lentivirales modificadas que comprenden un scFv anti-CD3 y una glucoproteína cocal (“anti-CD3scFv”) con partículas lentivirales modificadas que comprenden un anti-CD3scFv, una proteína CD58 y una proteína CD80, además de una glucoproteína cocal (“proteína Tri”).

La FIG. 36A incluye gráficos que ilustran datos comparativos de activación que muestran la activación dependiente de la dosis de las células T CD4 y CD8 en respuesta a la incubación con cada tipo de partícula. La FIG. 36B incluye gráficos que ilustran datos comparativos de unión de partículas y células T. La FIG. 36C incluye gráficos que ilustran datos comparativos de transducción que muestran la eficiencia de transducción dependiente de la dosis y el número total de células T CD4 y CD8 transducidas tras la incubación con cada tipo de partícula. La FIG. 36D incluye gráficos que ilustran datos comparativos de producción de citoquinas que muestran la estimulación dependiente de la dosis de IFN- γ , IL-2 y TNF- α tras la incubación con cada tipo de partícula. La FIG. 36E incluye un gráfico que ilustra datos comparativos de estimulación en serie. La FIG. 36F incluye gráficos que demuestran que las células incubadas con partículas que comprenden un anti-CD3scFv, una proteína CD58 y una proteína CD80 ("proteína Tri") produjeron más citoquinas inflamatorias que las células incubadas con partículas que comprenden un anti-CD3 scFv ("anti-CD3scFv"), pero no moléculas coestimuladoras ni de adhesión. La FIG. 36G incluye gráficos que demuestran que las partículas que comprenden un anti-CD3scFv, una proteína CD58 y una proteína CD80 fueron capaces de generar una mayor proporción de células T CD4 y CD8 CCR7+ y CD27+ en comparación con las partículas que comprenden un anti-CD3 scFv, pero sin moléculas coestimuladoras ni de adhesión.

[0198] La FIG. 37 describe un estudio in vivo en ratones para evaluar la función de partículas que comprenden un scFv anti-CD3, pero sin moléculas coestimuladoras ni de adhesión, y partículas que comprenden un scFv anti-CD3, una proteína CD58 y una proteína CD80. La FIG. 37A muestra el diseño del estudio. La FIG. 37B incluye gráficos que ilustran los datos de activación in vivo a distintos niveles de dosis de partículas. La FIG. 37C incluye gráficos que ilustran la transducción in vivo de células T a distintos niveles de dosis de partículas. La FIG. 37D incluye gráficos que muestran el crecimiento y el control del tumor a lo largo del estudio y, en particular, que las partículas de proteína tri controlaron el crecimiento del tumor en mayor medida que las partículas de scFv anti-CD3.

[0199] La FIG. 38 incluye datos que comparan partículas modificadas que comprenden CD58, CD80 y un scFv anti-CD3 expresados por separado con partículas modificadas que comprenden una proteína de fusión que comprende CD58, scFv anti-CD3 y CD80 expresados conjuntamente. La FIG. 38A incluye gráficos que ilustran datos de unión de partículas y células T. La FIG. 38B incluye gráficos que ilustran datos comparativos de activación en diferentes MOI. La FIG. 38C incluye gráficos que ilustran datos de transducción en diferentes MOI. La FIG. 38D incluye gráficos que muestran la producción

de citoquinas por las células tras la incubación con las dos variaciones de partículas modificadas.

[0200] La FIG. 39 describe un estudio in vivo en ratones para evaluar la función de partículas que comprenden CD58, CD80 y un scFv anti-CD3 expresados por separado con partículas modificadas que comprenden una proteína de fusión que comprende CD58, scFv anti-CD3 y CD80 expresados conjuntamente. La FIG. 39A incluye gráficos que ilustran datos de activación in vivo a diversos niveles de dosis de partículas. La FIG. 39B incluye gráficos que ilustran la transducción in vivo de células T a diferentes niveles de dosis de partículas. La FIG. 39C incluye gráficos que demuestran el crecimiento y el control del tumor a lo largo del estudio y, en particular, muestran que las partículas de proteína de fusión controlaron el crecimiento del tumor en mayor medida que las partículas que comprenden CD58, CD80 y un scFv anti-CD3 expresados por separado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0201] La presente divulgación se refiere, en general, a una partícula viral modificada superficialmente que comprende un genoma vector que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, en donde la partícula viral transduce células inmunitarias in vivo. En particular, la presente divulgación se refiere a partículas que comprenden moléculas de fusión para su uso en la transducción de células diana, tales como células inmunitarias o, específicamente, células T. En un aspecto, la divulgación proporciona una partícula para la generación in vivo de células CAR-T, que comprende, mostrada en la superficie de la partícula, una molécula de fusión que comprende una molécula de adhesión unida a una molécula coestimuladora, una molécula de activación o ambas.

[0202] El término “transducción” se utiliza en su sentido más amplio para referirse a la administración de un agente a una célula, como un agente terapéutico. El agente puede ser una molécula pequeña, un polinucleótido o un polipéptido. Se puede administrar una combinación de agentes, como varios polinucleótidos o un complejo de proteína-ácido nucleico (por ejemplo, una nucleasa de edición génica en complejo con ácido nucleico guía).

[0203] Las moléculas de fusión de la presente divulgación combinan una molécula de adhesión con una molécula coestimuladora, una molécula de activación o ambas. Sin estar limitado por la teoría, se cree que la inclusión de dos o más de estos tipos de moléculas en una molécula de fusión puede hacer que dicha partícula, cuando se encuentra con una célula diana, forme un complejo macromolecular en la interfaz de la partícula y la célula que actúa como un clúster de activación supramolecular artificial (SMAC).

[0204] Las células T que se encuentran con una célula presentadora de antígenos (APC) forman una sinapsis inmunitaria conocida como SMAC. En los SMAC naturales, la APC presenta un antígeno en complejo con una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) al receptor de células T (TCR) en una célula T; CD80 o CD86 interactúan con CD28 para proporcionar una señal coestimuladora; y CD58 interactúa con CD2 para adherir la APC a la célula T. Las interacciones entre CD58 y CD2 también pueden proporcionar una señal activadora o coestimuladora. La molécula de adhesión que se muestra en una partícula puede ser CD58. Las SMAC pueden presentar además moléculas coestimuladoras. Las moléculas coestimuladoras que pueden mostrarse en una partícula incluyen CD80 y CD86.

[0205] Según lo contemplado en la presente divulgación, una partícula puede diseñarse para mostrar en su superficie cualquiera de las moléculas de adhesión o moléculas coestimuladoras anteriores; fragmentos extracelulares de las mismas; o fragmentos funcionales de las mismas. Las partes extracelulares de estas moléculas pueden identificarse en bases de datos como UniProt, disponible en www.uniprot.org, o pueden predecirse utilizando métodos como el implementado por el programa TMHMM 2.0, disponible en services.healthtech.dtu.dk. Además, en algunos casos, los fragmentos funcionales de cada uno se identifican en la literatura científica o pueden identificarse utilizando métodos de laboratorio. Por ejemplo, se pueden predecir los fragmentos identificados de una proteína que probablemente forme dominios bien plegados. Los fragmentos se pueden probar en ensayos de unión contra una molécula cognada, o se pueden utilizar en ensayos de pull-down en comparación con la molécula completa. Ensayos funcionales, como la expresión de un reportero fluorescente bajo el control de un promotor activado por la señalización de las células T (por ejemplo, el promotor NKkB) cuando una célula T entra en contacto con una célula o partícula que expresa un fragmento funcional putativo. La secuencia de la molécula de adhesión, la molécula coestimuladora o la molécula de activación puede variarse para identificar y utilizar variantes que conserven la función. Por ejemplo, se pueden realizar mutaciones conservadoras en una molécula o se puede mutar aleatoriamente una molécula y confirmar experimentalmente la función de la variante.

[0206] Una molécula de adhesión, una molécula coestimuladora y una molécula de activación pueden estar unidas en cualquier orden, con solo el extremo N-terminal o C-terminal de las moléculas conectado a una región transmembrana o ancla. En una variante, la molécula de fusión comprende o está asociada con otra molécula asociada a la membrana, mostrando así la molécula de fusión en la partícula. El término “mostrar” se utiliza, en sentido amplio, para referirse a la posición en la superficie de la partícula en donde la molécula puede entrar en contacto con moléculas cognadas en la célula diana.

Receptores de antígenos quiméricos (CAR)

[0207] En algunas formas de realización, se utiliza una partícula, como una partícula lentiviral descrita en el presente documento, para transducir una secuencia de ácido nucleico (polinucleótido) que codifica uno o más receptores de antígenos quiméricos (CAR) en una célula (por ejemplo, un linfocito T). En algunas formas de realización, la transducción de la partícula lentiviral da lugar a la expresión de uno o más CAR en las células transducidas.

[0208] Los CAR son proteínas artificiales unidas a la membrana que dirigen un linfocito T hacia un antígeno y estimulan al linfocito T para que destruya las células que presentan el antígeno. Véase, por ejemplo, Eshhar, patente US N.º 7.741.465. En general, los CAR son receptores modificados genéticamente que comprenden un dominio extracelular que se une a un antígeno, por ejemplo, un antígeno en una célula, un enlazador opcional, un dominio transmembrana y un dominio intracelular (citoplasmático) que comprende un dominio coestimulador y/o un dominio de señalización que transmite una señal de activación a una célula inmunitaria. Con un CAR, se puede programar un único receptor para que reconozca un antígeno específico y, cuando se une a ese antígeno, active la célula inmunitaria para que ataque y destruya la célula que porta ese antígeno. Cuando estos antígenos existen en las células tumorales, una célula inmunitaria que expresa el CAR puede atacar y destruir la célula tumoral. Si se cumplen todas las demás condiciones, cuando un CAR se expresa en la superficie de, por ejemplo, un linfocito T, y el dominio extracelular del CAR se une a un antígeno, el dominio de señalización intracelular transmite una señal al linfocito T para que se active y/o prolifere y, si el antígeno está presente en la superficie celular, para que destruya la célula que expresa el antígeno. Dado que los linfocitos T pueden necesitar dos señales, una señal de activación primaria y una señal coestimuladora, para activarse al máximo, los CAR pueden comprender un dominio estimulador y un dominio coestimulador, de modo que la unión del antígeno al dominio extracelular da lugar a la transmisión tanto de una señal de activación primaria como de una señal coestimuladora. Se conocen algunos CAR ilustrativos en la técnica y pueden diseñarse de forma modular, por ejemplo, como se describe en (véase, por ejemplo, Guedan S, Calderon H, Posey AD, Maus MV, *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. 2019; 12: 145-156), incorporado por referencia.

[0209] En algunas formas de realización, una partícula lentiviral descrita en el presente documento comprende un polinucleótido que codifica un CAR que comprende un dominio extracelular que se une al CD19, un dominio bisagra, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. En algunas formas de

realización, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio coestimulador y un dominio de activación. En algunas formas de realización, los dominios coestimulador y de activación son un único dominio, por ejemplo, un único dominio intracelular que proporciona señales de coestimulación y activación a una célula. En otras formas de realización, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio coestimulador o un dominio de activación. En algunas formas de realización, el CAR comprende un dominio extracelular, un dominio bisagra CD8a, un dominio transmembrana CD8a, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización CD3zeta. En algunas formas de realización, una partícula lentiviral descrita en el presente documento comprende un polinucleótido que codifica un CAR que comprende un dominio extracelular, una bisagra CD8a, un dominio transmembrana CD28, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización CD3zeta.

Dominio intracelular CAR

[0210] En algunas formas de realización, el dominio intracelular del CAR es o comprende un dominio o motivo intracelular de una proteína que se expresa en la superficie de los linfocitos T y desencadena la activación y/o proliferación de dichos linfocitos T. En algunas formas de realización, dicho dominio o motivo es capaz de transmitir una señal para la activación de un linfocito T en respuesta a la unión de un antígeno a la porción extracelular del CAR. En algunas formas de realización, este dominio o motivo comprende, o es, un ITAM (motivo de activación basado en tirosina del inmunorreceptor). Los polipéptidos que contienen ITAM adecuados para los CAR incluyen, por ejemplo, la cadena zeta CD3 (CD3 ζ) o partes de la misma que contienen ITAM. En algunas formas de realización, el dominio intracelular es un dominio de señalización intracelular CD3 ζ . En algunas formas de realización, el dominio intracelular procede de una cadena receptora de linfocitos, una proteína del complejo TCR/CD3, una subunidad del receptor Fc o una subunidad del receptor IL-2. En algunas formas de realización, el dominio de señalización intracelular del CAR puede ser los dominios de señalización de, por ejemplo, CD3 ζ , CD3 ϵ , CD22, CD79a, CD66d o CD39. “Dominio de señalización intracelular” se refiere a la parte de un polipéptido CAR que participa en la transducción del mensaje de unión efectiva del CAR a un antígeno diana al interior de la célula efectora inmunitaria para provocar la función de la célula efectora, por ejemplo, la activación, la producción de citoquinas, la proliferación y la actividad citotóxica, incluida la liberación de factores citotóxicos a la célula diana unida al CAR, u otras respuestas celulares provocadas tras la unión del antígeno al dominio CAR extracelular.

[0211] En algunas formas de realización, el dominio intracelular del CAR es la cadena zeta CD3 (CD3zeta).

[0212] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polipéptido que comprende un CAR cuyo dominio intracelular comprende un dominio CD3zeta que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 82.

[0213] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR (SEQ ID NO: 82)

[0214] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un ácido nucleico que codifica el dominio intracelular de un CAR que comprende un dominio CD3zeta que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 83.

[0215] CGCGTGAAGTTCAGCCGGTCCGCCGATGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCA GAACCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGGCCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTG GATAAGAGGAGGGGAAGGGACCCAGAGATGGGAGGCAAGCCTCGGAGAAAGAACC CACAGGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTATTCT GAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGGCGCCGGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTAC CAGGGCCTGAGCACCGCCACAAAGGACACATATGATGCCCTGCACATGCAGGCCCT GCCACCTAGG (SEQ ID NO: 83)

[0216] En algunas formas de realización, el CAR comprende adicionalmente uno o más dominios o motivos coestimuladores, por ejemplo, como parte del dominio intracelular del polipéptido.

[0217] Las moléculas coestimuladoras pueden incluir moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígenos o los receptores Fc que proporcionan una segunda señal útil para la activación y el funcionamiento eficaces de los linfocitos T tras la unión al antígeno. El dominio o los dominios coestimuladores pueden ser, por ejemplo, o comprender, uno o más de una secuencia polipeptídica coestimuladora CD27, una secuencia polipeptídica coestimuladora CD28, una secuencia polipeptídica coestimuladora OX40 (CD134), una secuencia polipeptídica coestimuladora 4-1BB (CD137) o una secuencia polipeptídica coestimuladora inducible de células T (ICOS), u otro dominio o motivo coestimulador, o cualquier combinación de los mismos. En algunas formas de realización, uno o más dominios coestimuladores se seleccionan del grupo que consiste en dominios intracelulares de 4-1BB, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM y ZAP70.

[0218] En algunas formas de realización, el dominio coestimulador es un dominio intracelular de 4-1BB, CD28 u OX40. En la patente US N.º 7.446.190, incorporada por

referencia, se describen construcciones CAR ilustrativas que comprenden un dominio de señalización CD28. En las patentes US Nros. 9.856.322 y N.º 8.399.964, ambas incorporadas por referencia, se describen constructos CAR ilustrativos que comprenden un dominio de señalización 4-1BB.

[0219] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polinucleótido o un polipéptido que codifica un CAR que comprende un enlazador IgG4 unido operativamente a un dominio transmembrana CD28 unido operativamente a un dominio coestimulador 4-1BB unido operativamente a un dominio de señalización CD3zeta.

[0220] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polinucleótido o un polipéptido que codifica un CAR que comprende un enlazador IgG4 unido operativamente a un dominio transmembrana CD8a unido operativamente a un dominio coestimulador 4-1BB unido operativamente a un dominio de señalización CD3zeta.

[0221] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polinucleótido o un polipéptido que codifica un CAR que comprende un enlazador IgG4 unido operativamente a un dominio transmembrana CD8a unido operativamente a un dominio coestimulador CD28 unido operativamente a un dominio de señalización CD3zeta.

[0222] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polinucleótido o un polipéptido que codifica un CAR que comprende un enlazador CD8a unido operativamente a un dominio transmembrana CD8a unido operativamente a un dominio coestimulador 4-1BB unido operativamente a un dominio de señalización CD3zeta.

[0223] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polinucleótido o un polipéptido que codifica un CAR que comprende un enlazador CD28 unido operativamente a un dominio transmembrana CD28 unido operativamente a un dominio coestimulador CD28 unido operativamente a un dominio de señalización CD3zeta.

[0224] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polipéptido que comprende un CAR cuyo dominio intracelular comprende una secuencia polipeptídica coestimuladora 4-1BB que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 84.

[0225] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 84)

[0226] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un ácido nucleico que codifica el dominio intracelular de un CAR que comprende una secuencia

coestimuladora 4-1BB que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 85.

[0227] CGCGTGAAGTTCAGCCGGTCCGCCGATGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCA
GAACCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGGCCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTG
GATAAGAGGAGGGGAAGGGACCCAGAGATGGGAGGCAAGCCTCGGAGAAAGAACC
CACAGGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTATTCT
GAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGGGCGCCGGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTAC
CAGGGCCTGAGCACCGCCACAAAGGACACATATGATGCCCTGCACATGCAGGCCCT
GCCACCTAGG (SEQ ID NO: 85)

[0228] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polipéptido que comprende un CAR cuyo dominio intracelular comprende un enlazador IgG4 unido operativamente a un dominio transmembrana CD28 unido operativamente a un polipéptido coestimulador 4-1BB unido operativamente a un dominio CD3zeta que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 86.

[0229] ESKYGPPCPPCPMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPF
MRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 86)

[0230] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un ácido nucleico que codifica el dominio intracelular de un CAR que comprende un enlazador IgG4 unido operativamente a un dominio transmembrana CD28 unido operativamente a un polipéptido coestimulador 4-1BB unido operativamente a un dominio CD3zeta que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 87.

[0231] GAGTCTAAGTATGGCCCTCCATGCCCCCTTGTCTATGTTCTGGGTGCTGG
TGGTGGTGGGAGGCGTGCTGGCCTGTTACTCCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTTATC
ATCTTCTGGGTGAAGCGCGGCCGGAAGAAGCTGCTGTATATCTTTAAGCAGCCCTT
CATGAGACCTGTGCAGACCACACAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGTAGGTTTCCA
GAGGAGGAGGAGGGAGGATGCGAGCTGCGCGTGAAGTTCTCTCGGAGCGCCGATG
CCCCTGCCTACCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGGCCGG
AGAGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGGAAGAGACCCAGAGATGGGAG
GCAAGCCTCGGAGAAAGAACCCACAGGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGA
CAAGATGGCCGAGGCCTATTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGGCGCCGGGGC
AAGGGACACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACAAAGGACACCTATG
ATGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCACCCAGG (SEQ ID NO: 87)

[0232] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polipéptido que comprende un CAR cuyo dominio intracelular comprende un enlazador IgG4 unido operativamente a un dominio transmembrana CD28 unido operativamente a un polipéptido coestimulador 4-1BB unido operativamente a un dominio CD3zeta que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 88.

[0233] ESKYGPPCPPCPMFVVLVVGGVLACYSLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPF
MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:
88)

[0234] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un ácido nucleico que codifica el dominio intracelular de un CAR que comprende un enlazador IgG4 unido operativamente a un dominio transmembrana CD28 unido operativamente a un polipéptido coestimulador 4-1BB unido operativamente a un dominio CD3zeta que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 89.

[0235] GAGTCCAAGTACGGCCACCCCTGCCCTCCATGTCCCATGTTTTGGGTGCTG
GTGGTGGTGGGAGGCGTGCTGGCCTGTTATTCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCAT
CATCTTTTGGGTGAAGCGCGGCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCT
TCATGAGACCCGTGCAGACCACACAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGTAGGTTCCC
AGAGGAGGAGGAGGGAGGATGCGAGCTGAGGGTGAAGTTTTCCCGGTCTGCCGAT
GCCCCTGCCTATCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAATCTGGGCAG
GCGCGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGAGAGGAAGGGACCCCTGAGATGGGA
GGCAAGCCAAGGCGCAAGAACCCTCAGGAGGGCCTGTATAATGAGCTGCAGAAGG
ACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAGCGGAGAAGGGG
CAAGGGACACGATGGCCTGTATCAGGGCCTGAGCACCGCCACAAAGGACACCTAC
GATGCACTGCACATGCAGGCCCTGCCACCTAGAGGATCTGGAGCCACAACTTCAG
CCTGCTGAAGCAGGCCGCGCATGTGGAGGAGAATCCTGGACCA (SEQ ID NO: 89)

[0236] En algunas formas de realización, el dominio intracelular puede modificarse aún más para codificar una proteína detectable, por ejemplo, una proteína fluorescente (por ejemplo, proteína fluorescente verde) o cualquier variante de la misma.

Región transmembrana CAR

[0237] La región transmembrana puede ser cualquier región transmembrana que pueda incorporarse a un CAR funcional, por ejemplo, una región transmembrana de una molécula CD28, CD4 o CD8.

[0238] En algunas formas de realización, el dominio transmembrana del CAR puede ser el dominio transmembrana del CD8, una cadena alfa, beta o zeta de un receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1 BB (CD137), 4-1 BBL, GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRFI), CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R a, 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, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, NKG2D “en orientación inversa” y/o NKG2C. En algunas formas de realización, el dominio transmembrana del CAR puede ser el dominio transmembrana del CD28. En algunas formas de realización, el dominio transmembrana de un CAR puede ser el dominio transmembrana del CD8, por ejemplo, el CD8 α .

Región de enlace CAR

[0239] El enlazador o bisagra opcional de CAR situado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana puede ser un polipéptido de entre 2 y más de 100 aminoácidos de longitud. El enlazador puede incluir o estar compuesto por residuos flexibles, como glicina y serina, de modo que los dominios proteicos adyacentes puedan moverse libremente entre sí. Se pueden utilizar enlazadores más largos, por ejemplo, cuando se desea garantizar que dos dominios adyacentes no interfieran estéricamente entre sí. Los enlazadores más largos también pueden ser ventajosos cuando el antígeno diana está más cerca de la superficie celular.

[0240] En algunas formas de realización, el enlazador procede de una región bisagra o de una parte de la región bisagra de cualquier inmunoglobulina u otra proteína transmembrana. Por ejemplo, la región bisagra puede proceder de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, PD1, CD8 o CD28, o una parte de los mismos. En algunas formas de realización, el enlazador procede de una parte de una inmunoglobulina, por ejemplo IgG4. En algunas formas de realización, el enlazador es una parte de una inmunoglobulina, por ejemplo IgG1. En algunas formas de realización, el enlazador es una parte del dominio extracelular de CD28. En otras formas de realización, el enlazador es una parte del dominio extracelular de CD8. En otras formas de realización, el enlazador es una parte del dominio extracelular de PD1.

[0241] En algunas formas de realización, el enlazador es un enlazador IgG4 unido de manera operativa a un dominio transmembrana CD28 que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 90.

[0242] ESKYGPPCPPCPMFVVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 90)

[0243] En algunas formas de realización, el enlazador es un enlazador IgG4 unido de manera operativa a un dominio transmembrana CD28 que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 91.

[0244] GAGTCTAAGTATGGCCCACCCTGCCCTCCATGTCCAATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGAGGCGTGCTGGCCTGTTACTCCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTTATCATCTTCTGGGTG (SEQ ID NO: 91)

Dominio extracelular CAR

[0245] En algunas formas de realización, el ácido nucleico transducido en células utilizando los métodos descritos en el presente documento comprende una secuencia que codifica un polipéptido, en donde el dominio extracelular del polipéptido se une a un antígeno de interés. En algunas formas de realización, el dominio extracelular comprende un receptor, o una parte de un receptor, que se une a dicho antígeno. En algunas formas de realización, el dominio extracelular comprende, o es, un anticuerpo o una parte del mismo que se une al antígeno. En algunas formas de realización, el dominio extracelular comprende, o es, un dominio Fv de cadena única. El dominio Fv de cadena única puede comprender, por ejemplo, un VL unido a VH mediante un enlazador flexible, en donde dicho VL y VH proceden de un anticuerpo que se une a dicho antígeno.

[0246] En algunas formas de realización, el dominio extracelular del CAR puede contener cualquier polipéptido que se una al antígeno deseado (por ejemplo, un neoantígeno de próstata o un antígeno expresado en un tumor de interés). El dominio extracelular puede comprender un scFv, una parte de un anticuerpo o un andamio alternativo. Los CAR también pueden diseñarse para unirse a dos o más antígenos deseados que pueden disponerse en tándem y separarse mediante secuencias enlazadoras. Por ejemplo, uno o más anticuerpos de dominio, scFv, anticuerpos VHH de llama u otros fragmentos de anticuerpos VH únicos pueden organizarse en tándem a través de un enlazador para proporcionar bispecificidad o multiespecificidad al CAR.

[0247] En algunas formas de realización, el antígeno se expresa en una célula maligna de células B, una célula maligna recidivante/refractaria que expresa CD19, una célula de linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), una célula de linfoma de células B grandes de tipo Burkitt (B-LBL), una célula de linfoma folicular (FL), una célula de leucemia

linfocítica crónica (CLL), células de leucemia linfocítica aguda (LLA), células de linfoma de células del manto (MCL), células malignas hematológicas, células de cáncer de colon, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de hígado, células de cáncer de mama, células de cáncer renal, células de cáncer de próstata, células de cáncer de ovario, células de cáncer de piel, células de melanoma, células de cáncer de huesos, células de cáncer de cerebro, células de carcinoma escamoso, células de leucemia, células de mieloma, células de linfoma de células B, células de cáncer de riñón, células de cáncer de útero, células de adenocarcinoma, células de cáncer de páncreas, células de leucemia mielógena crónica, células de glioblastoma, células de neuroblastoma, células de meduloblastoma o células de sarcoma.

[0248] En algunas formas de realización, el CAR es un CAR de segunda generación que comprende un scFv antilfluoresceína unido al dominio coestimulador 4-1BB y al dominio de señalización intracelular CD3zeta.

[0249] En algunas formas de realización, el antígeno es CD19. Las terapias CAR T dirigidas contra CD19 han sido aprobadas por la FDA e incluyen Yescarta, Tecartus, Kymriah y Breyanzi. Los CAR dirigidos contra el CD19 se describen, por ejemplo, en la publicación US N.º 20160152723, la patente US N.º 10.736.918, la patente US N.º 10.357.514 y la patente US N.º 7.446.190, todas ellas incorporadas por referencia.

[0250] En algunas formas de realización, un CAR comprende un dominio extracelular que comprende un dominio de unión scFv FMC63 para la unión al CD19. En algunas formas de realización, el CAR es un CAR de segunda generación que comprende el scFv FMC63 de ratón anti-CD19 humano unido al dominio coestimulador 4-1BB y al dominio de señalización intracelular CD3zeta. En algunas formas de realización, un CAR comprende un dominio de unión para CD19, una bisagra CD8a, un dominio transmembrana CD8a, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización CD3zeta. En algunas formas de realización, un CAR comprende un dominio de unión para CD19, una bisagra IgG4, un dominio transmembrana CD28, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización CD3zeta. En algunas formas de realización, un CAR comprende un dominio de unión para CD19, una bisagra CD28, un dominio transmembrana CD28, un dominio coestimulador CD28 y un dominio de señalización CD3zeta. En algunas formas de realización, un CAR comprende un dominio extracelular que comprende un dominio de unión scFv FMC63 para la unión al CD19, una bisagra CD8a, un dominio transmembrana CD8a, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización CD3zeta. En algunas formas de realización, un CAR comprende un dominio extracelular que comprende un dominio de unión FMC63 scFv para la unión a CD19, una bisagra IgG4, un dominio transmembrana CD28, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización CD3zeta. En algunas formas de

realización, un CAR comprende un dominio extracelular que comprende un dominio de unión FMC63 scFv para la unión al CD19, una bisagra CD28, un dominio transmembrana CD28, un dominio coestimulador CD28 y un dominio de señalización CD3zeta.

[0251] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polipéptido que comprende un CAR cuyo dominio extracelular comprende una secuencia señal hCSF2R (receptor α de la cadena del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humanos (GM-CSF)) que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 92.

[0252] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP (SEQ ID NO: 92)

[0253] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polinucleótido que codifica un CAR cuyo dominio extracelular comprende un α CD19 scFv (CD19 VL unido a un CD19 VH) que comparte al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 93.

[0254] DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 93)

[0255] Las regiones determinantes complementarias (CDR) de este scFv anti-CD19 de SEQ ID NO: 93 son RASQDISKYLN, (CDR-L1; SEQ ID NO: 94), HTSRLHS (CDR-L2; SEQ ID NO: 95), QQGNTLPYT (CDR-L3; SEQ ID NO: 96), DYGV (CDR-H1; SEQ ID NO: 97), VIWGSSETTYNSALKS (CDR-H2; SEQ ID NO: 98), HYYYGGSYAMDY (CDR-H3; SEQ ID NO: 99). En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polinucleótido que codifica un CAR cuyo dominio extracelular comprende un α CD19 scFv que tiene estos CDR, en donde opcionalmente el α CD19 scFv comparte al menos un 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 % de identidad con SEQ ID NO: 93.

[0256] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polinucleótido que codifica un CAR cuyo dominio extracelular comprende un α CD19 scFv que tiene estos CDR, en donde, opcionalmente, el scFv α CD19 comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 93 o 100.

[0257] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL

PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD
DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 100)

[0258] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de señal hCSF2R (receptor α de la cadena del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humanos (GM-CSF)) secuencia de señal para el dominio extracelular de CAR que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o el 100 % de identidad con SEQ ID NO: 101.

[0259] ATGCTGCTGCTGGTGACCTCCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCTCACCCAGCC
TTTCTGCTGATCCCC (SEQ ID NO: 101)

[0260] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de un CAR que comprende un scFv α CD19 que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 102.

[0261] GACATCCAGATGACACAGACCACAAGCTCCCTGTCTGCCAGCCTGGGCGAC
AGAGTGACCATCTCCTGTAGGGCCTCTCAGGATATCAGCAAGTACCTGAACTGGTAT
CAGCAGAAGCCAGATGGCACAGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCTCCAGGCTGCA
CTCTGGAGTGCCAAGCCGGTTCTCCGGATCTGGAAGCGGCACCGACTATTCCCTGA
CAATCTCTAACCTGGAGCAGGAGGATATCGCCACATACTTTTGCCAGCAGGGCAATA
CCCTGCCATATACATTCGGCGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGATCCACATCT
GGAAGCGGCAAGCCAGGAAGCGGAGAGGGATCCACAAAGGGAGAGGTGAAGCTG
CAGGAGAGCGGACCAGGACTGGTGGCACCATCCCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTA
CAGTGTCCGGCGTGTCTCTGCCTGACTACGGCGTGTCTGATCAGGCAGCCACCT
AGGAAGGGACTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCTCTGAGACCACATACTATAA
TTCTGCCCTGAAGAGCCGCCTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGTCTCAGGTGTT
TCTGAAGATGAATAGCCTGCAGACCGACGATACAGCCATCTACTATTGCGCCAAGCA
CTACTATTACGGCGGCTCCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGA
CAGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 102)

[0262] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polipéptido que comprende un CAR cuyo dominio extracelular comprende un scFv α CD19 que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 103.

[0263] MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW
YQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP
YTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL

PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD
DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 103)

[0264] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de un CAR que comprende un scFv α CD19 que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 104.

[0265] ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCACACCCTGCC
TTCCTGCTGATCCCAGATATCCAGATGACACAGACCACATCCTCTCTGTCCGCCTCT
CTGGGCGACAGAGTGACCATCTCTTGTAGGGCCAGCCAGGATATCTCCAAGTACCT
GAACTGGTATCAGCAGAAGCCTGACGGCACAGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCT
CTAGGCTGCACAGCGGAGTGCCATCCCGGTTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACAGA
CTATTCTCTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGATATCGCCACATACTTTTGCCA
GCAGGGCAATACCCTGCCATATACATTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCG
GAAGCACATCCGGATCTGGCAAGCCAGGATCCGGAGAGGGATCTACAAAGGGAGA
GGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGACCAGGACTGGTGGCACCCAGCCAGTCCCTGTCT
GTGACCTGTACAGTGTCTGGCGTGAGCCTGCCCCGATTACGGCGTGTCTCTGGATCAG
ACAGCCACCAAGGAAGGGACTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCTCTGAGACC
ACATACTATAATAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAG
TCCCAGGTGTTTCTGAAGATGAATAGCCTGCAGACCGACGATACAGCCATCTACTAT
TGCGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCTCCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGG
CACCTCCGTGACAGTGAGCTCC (SEQ ID NO: 104)

[0266] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polinucleótido que codifica un CAR cuyo dominio extracelular comprende un scFv α CD19 que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 100.

[0267] Las regiones determinantes complementarias (CDR) de este scFv son RASQDISKYLN, (CDR-L1; SEQ ID NO: 94), HTSRLHS (CDR-L2; SEQ ID NO: 95), QQGNTLPYT (CDR-L3; SEQ ID NO: 96), DYGV (CDR-H1; SEQ ID NO: 97), VIWGSETTYNSALKS (CDR-H2; SEQ ID NO: 98), HYYYGGSYAMDY (CDR-H3; SEQ ID NO: 99). En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un polinucleótido que codifica un CAR cuyo dominio extracelular comprende un scFv α CD19 que tiene estos CDR, en donde, opcionalmente, el scFv α CD19 comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 100.

[0268] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de un CAR que comprende un scFv α CD19

que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 105.

[0269] ATGCTGCTGCTGGTGACATCCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCACACCCAGCC
TTCTGCTGATCCCCGATATCCAGATGACCCAGACCACAAGCTCCCTGAGCGCCTC
CCTGGGCGACAGGGTGACAATCTCTTGTCTGGGCCAGCCAGGATATCTCCAAGTATC
TGAATTGGTACCAGCAGAAGCCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTATCACACA
TCTAGACTGCACAGCGGCGTGCCTTCCAGGTTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGA
CTACTCTCTGACAATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGATATCGCCACCTATTTCTGCCA
GCAGGGCAATACCCTGCCTTACACATTTGGCGGGCGGCACAAAGCTGGAGATCACCG
GCTCTACAAGCGGATCCGGCAAGCCAGGATCCGGAGAGGGATCTACCAAGGGAGA
GGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGACCTGGACTGGTGGCACCATCTCAGAGCCTGTCC
GTGACCTGTACAGTGTCTGGCGTGAGCCTGCCAGATTATGGCGTGAGCTGGATCAG
GCAGCCACCTAGGAAGGGACTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCTCCGAGACC
ACATACTATAACAGCGCCCTGAAGTCCCGCCTGACCATCATCAAGGACAACCTCTAAG
AGCCAGGTGTTCTGAAGATGAATTCCCTGCAGACCGACGATACAGCCATCTACTAT
TGCGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCTCTTATGCCATGGATTACTGGGGCCAGGG
CACCAGCGTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 105)

[0270] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral descrita en el presente documento comprende un ácido nucleico que codifica un CAR que comprende un dominio bisagra IgG4 modificado que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 187, 188 o 189. En algunas formas de realización, la partícula lentiviral descrita en el presente documento comprende un ácido nucleico que codifica un CAR que comprende un dominio bisagra PD1 que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 190. En algunas formas de realización, la partícula lentiviral descrita en el presente documento comprende un ácido nucleico que codifica un CAR que comprende un dominio bisagra IgG1 que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, o identidad del 100 % con SEQ ID NO: 191. En algunas formas de realización, la partícula lentiviral descrita en el presente documento comprende un ácido nucleico que codifica un CAR que comprende un dominio bisagra CD8 que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, o identidad del 100 % con SEQ ID NO: 192. En algunas formas de realización, la partícula lentiviral descrita en el presente documento comprende un ácido nucleico que codifica un CAR que comprende un dominio bisagra CD28 que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 75 %, al

menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, o identidad al 100 % con SEQ ID NO: 193.

[0271] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de un CAR que comprende un scFv anti-CD19 que comprende una secuencia de ácido nucleico que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, o identidad al 100 % con SEQ ID NO: 194. En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de un CAR que comprende un scFv anti-CD19 que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, o identidad del 100 % con SEQ ID NO: 195. En algunas formas de realización, el VL α CD19 scFv comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206.

[0272] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral descrita en el presente documento comprende un ácido nucleico que codifica un CAR que comprende un dominio bisagra CD8 que comprende una secuencia de ácido nucleico que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 196. En algunas formas de realización, la partícula lentiviral descrita en el presente documento comprende un ácido nucleico que codifica un CAR que comprende un dominio bisagra CD8 que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, o identidad al 100 % con SEQ ID NO: 197.

[0273] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral descrita en el presente documento comprende un ácido nucleico que codifica un CAR que comprende un dominio transmembrana CD28 que comprende una secuencia de ácido nucleico que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 198. En algunas formas de realización, la partícula lentiviral descrita en el presente documento comprende un ácido nucleico que codifica un CAR que comprende un dominio transmembrana CD28 que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, o identidad al 100 % con SEQ ID NO: 199.

[0274] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral descrita en el presente documento comprende un polinucleótido que codifica un CAR que comprende un dominio coestimulador 4-1BB que comprende una secuencia de ácido nucleico que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95

%, al menos 99 %, o identidad del 100 % con SEQ ID NO: 200. En algunas formas de realización, la partícula lentiviral descrita en el presente documento codifica un CAR que comprende un dominio coestimulador 4-1BB que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, o identidad al 100 % con SEQ ID NO: 201. En algunas formas de realización, la partícula lentiviral descrita en el presente documento comprende un polinucleótido que codifica un CAR que comprende un dominio de señalización CD3zeta que comprende una secuencia de ácido nucleico que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 202. En algunas formas de realización, la partícula lentiviral descrita en el presente documento codifica un CAR que comprende un dominio de señalización CD3zeta que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 203.

[0275] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un ácido nucleico que codifica un CAR anti-CD19 que comprende una secuencia de ácido nucleico que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 204. En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un ácido nucleico que codifica un CAR anti-CD19 que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 205.

Tabla 1

SEQ ID NO	SECUENCIA	Descripción
187	ESKYGPPCPPCPM	Bisagra IgG4 modificada
188	ESKYGPPSPPSPA	Bisagra IgG4 modificada
189	ESKYGPPSPPSP	Bisagra IgG4 modificada
190	PSPRPAGQFQTLV	Bisagra PD1
191	EPKSCDKTHTCP	Bisagra IgG1
192	GAVHTRGLDFACD	Bisagra CD8
193	LCPSPLFPGPSKP	Bisagra CD28
194	GACATCCAGATGACACAGACCACAAGCTCCCTGTCT GCCAGCCTGGGCGACAGAGTGACCATCTCCTGTAGG GCCTCTCAGGATATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATC AGCAGAAGCCAGATGGCACAGTGAAGCTGCTGATCT ACCACACCTCCAGGCTGCACTCTGGAGTGCCAAGCC GGTTCTCCGGATCTGGAAGCGGCACCGACTATTCCC TGACAATCTCTAACCTGGAGCAGGAGGATATCGCCA CATACTTTTGCCAGCAGGGCAATACCCTGCCATATAC ATTCGGCGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGATC CACATCTGGAAGCGGCAAGCCAGGAAGCGGAGAGG GATCCACAAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAGGAGAGC GGACCAGGACTGGTGGCACCATCCCAGTCTCTGAGC GTGACCTGTACAGTGTCCGGCGTGTCTCTGCCTGAC TACGGCGTGTCTGATCAGGCAGCCACCTAGGAAG GGACTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCTCTGA GACCACATACTATAATTCTGCCCTGAAGAGCCGCCTG ACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGTCTCAGGTGTTTC TGAAGATGAATAGCCTGCAGACCGACGATACAGCCA TCTACTATTGCGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCTC CTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCTCCGT GACAGTGTCTAGC	CAR scFv anti-CD19
195	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQ KPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISN	CAR scFv anti-CD19

	LEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKP GSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVS LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSR LTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSY AMDYWGQGTSTVTVSS	
196	GGCGCTGTGCACACCAGAGGACTGGATTTCGCCTGC GAC	CAR CD8 anti- CD19 con bisagra
197	GAVHTRGLDFACD	CAR CD8 anti- CD19 con bisagra
198	TTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGAGGCGTGCTGGC CTGTTACTCCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTTATCATC TTCTGGGTG	CAR CD28 anti- CD19 con dominio transmembrana
199	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	Dominios transmembrana del CAR anti-CD19 CD28
200	AAGAGAGGCAGGAAGAAGCTGCTGTATATCTTTAAGC AGCCCTTCATGCGCCCTGTGCAGACCACACAGGAGG AGGACGGCTGCAGCTGTCCGTTTCCAGAGGAGGAG GAGGGAGGATGCGAGCTG	CAR anti-CD19 41BB
201	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL	Polipéptido CAR anti-CD19 41BB
202	CGCGTGAAGTTCAGCCGGTCCGCCGATGCCCCTGCC TACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTATAACGAGCTG AATCTGGGCCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGAT AAGAGGAGGGGAAGGGACCCAGAGATGGGAGGCAA GCCTCGGAGAAAGAACCCACAGGAGGGCCTGTACAA TGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTATTC TGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGGCGCCGGGGCA AGGGACACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACC GCCACAAAGGACACATATGATGCCCTGCACATGCAG GCCCTGCCACCTAGG	CAR anti-CD19 CD3z
203	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R	Polipéptido CAR anti-CD19 CD3z

204	GACATCCAGATGACACAGACCACAAGCTCCCTGTCT GCCAGCCTGGGCGACAGAGTGACCATCTCCTGTAGG GCCTCTCAGGATATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATC AGCAGAAGCCAGATGGCACAGTGAAGCTGCTGATCT ACCACACCTCCAGGCTGCACTCTGGAGTGCCAAGCC GGTTCTCCGGATCTGGAAGCGGCACCGACTATTCCC TGACAATCTCTAACCTGGAGCAGGAGGATATCGCCA CATACTTTTGCCAGCAGGGCAATACCCTGCCATATAC ATTCGGCGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGATC CACATCTGGAAGCGGCAAGCCAGGAAGCGGAGAGG GATCCACAAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAGGAGAGC GGACCAGGACTGGTGGCACCATCCCAGTCTCTGAGC GTGACCTGTACAGTGTCCGGCGTGTCTCTGCCTGAC TACGGCGTGTCTGGATCAGGCAGCCACCTAGGAAG GGACTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCTCTGA GACCACATACTATAATTCTGCCCTGAAGAGCCGCCTG ACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGTCTCAGGTGTTTC TGAAGATGAATAGCCTGCAGACCGACGATACAGCCA TCTACTATTGCGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCTC CTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCTCCGT GACAGTGTCTAGCGGCGCTGTGCACACCAGAGGACT GGATTTCGCCTGCGACTTCTGGGTGCTGGTGGTGGT GGGAGGCGTGCTGGCCTGTTACTCCCTGCTGGTGAC CGTGGCCTTTATCATCTTCTGGGTGAAGAGAGGCAG GAAGAAGCTGCTGTATATCTTTAAGCAGCCCTTCATG CGCCCTGTGCAGACCACACAGGAGGAGGACGGCTG CAGCTGTTCGGTTTCCAGAGGAGGAGGAGGGAGGAT GCGAGCTGCGCGTGAAGTTCAGCCGGTCCGCCGAT GCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTAT AACGAGCTGAATCTGGGCCGGAGAGAGGAGTACGAC GTGCTGGATAAGAGGAGGGGAAGGGACCCAGAGAT GGGAGGCAAGCCTCGGAGAAAGAACCCACAGGAGG GCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCG AGGCCTATTCTGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGGC GCCGGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTACCAGGGC CTGAGCACCGCCACAAAGGACACATATGATGCCCTG	CAR anti-CD19 de longitud completa
-----	--	------------------------------------

	CACATGCAGGCCCTGCCACCTAGG	
205	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQ KPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISN LEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKP GSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVS LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSR LTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSY AMDYWGQGTSTVTVSSGAVHTRGLDFACDFWVLVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	Polipéptido CAR anti-CD19 de longitud completa
206	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQ KPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISN LEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT	Anti-CD19 CAR scFv VL
207	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Espaciador Anti- CD19 CAR scFv
208	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQ VFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSS	Anti-CD19 CAR scFv VH

[0276] En algunas formas de realización, el CAR es un CAR de segunda generación que comprende el scFv anti-CD19 humano de ratón FMC63 unido al dominio coestimulador CD28 y al dominio de señalización intracelular CD3zeta. En algunas formas de realización, el CAR es un CAR de segunda generación que comprende el scFv anti-CD19 humano de ratón FMC63 unido a un dominio transmembrana CD8, un dominio coestimulador 4-1BB y el dominio de señalización intracelular CD3zeta.

[0277] En algunas formas de realización de los polipéptidos descritos en el presente documento, el dominio extracelular se une al dominio transmembrana directamente o mediante un enlazador, un espaciador o una secuencia polipeptídica de bisagra, por ejemplo, una secuencia de CD28 o una secuencia de CTLA4.

[0278] En algunas formas de realización, el dominio extracelular que se une al antígeno deseado puede proceder de anticuerpos o de sus fragmentos de unión a antígenos generados utilizando las tecnologías descritas en el presente documento.

Moléculas de adhesión

[0279] En la presente memoria se describen, en algunas formas de realización, moléculas de adhesión. La molécula de adhesión puede estar incluida como parte de una molécula de fusión. La molécula de adhesión puede estar incluida como parte de una partícula (por ejemplo, en la superficie de una partícula).

[0280] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “molécula de adhesión” se refiere, en sentido amplio, a un componente molecular de una SMAC u otra sinapsis inmunitaria, distinto de una molécula de activación (por ejemplo, un agente de unión al TCR) o una molécula coestimuladora, que a su vez contribuye a la adhesión de una partícula a las células diana. Las moléculas de adhesión de origen natural pueden ser moléculas expresadas de forma nativa en células presentadoras de antígenos y adaptadas para su uso aquí en partículas. Se contemplan tanto las moléculas de adhesión naturales como sus variantes y las moléculas de adhesión artificiales, como los anticuerpos o fragmentos de los mismos. Una molécula de adhesión, tal como se utiliza en el presente documento, se une específicamente a una molécula conjugada con una afinidad suficiente para provocar un aumento de la adhesión entre la partícula y la célula diana en comparación con la adhesión de una partícula de referencia que carece de la molécula de adhesión a la misma célula diana o a una similar. El término “molécula de adhesión” incluye, entre otros, el CD58, una parte extracelular del CD58 y fragmentos funcionales del CD58. Como se ha descrito con anterioridad, el término “fragmento funcional” se utiliza en el presente documento para describir un fragmento de un polipéptido u otra molécula que conserva la función deseada del polipéptido. Por ejemplo, un fragmento funcional de CD58 es un fragmento de CD58 que se une específicamente a CD2. La molécula de adhesión puede ser una proteína, denominada en el presente documento “proteína de adhesión”.

[0281] En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora y/o de adhesión comprende una secuencia de aminoácidos 100 % idéntica a una secuencia de la tabla 2 o la tabla 3. En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora y/o de adhesión comparte al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con una secuencia de la Tabla 2 o la Tabla 3. En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora y/o de adhesión comparte menos del 80 %, menos del 85 %, menos del 90 %, menos del 91 %, menos del 92 %, menos del 93 %, menos del 94 %, menos del 95 %, menos del 96 %, menos del 97 %, menos del 98 %, menos del 99 % o menos del 100 % identidad a una secuencia de la Tabla 2 o la Tabla 3.

[0282] En la tabla 2 se proporcionan secuencias polipeptídicas de moléculas de adhesión ilustrativas, con las posiciones “inicial” y “final” de la parte extracelular de cada una. En cada caso, la molécula de adhesión puede comprender un polipéptido con al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con cualquier secuencia de la tabla 2, o fragmentos funcionales de la misma. Los fragmentos funcionales pueden ser o incluir cualquier porción de 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 o 600 (o cualquier rango de los mismos) aminoácidos que conserve la afinidad de unión con su molécula cognada, cuando se mide mediante ensayos de afinidad, como interferometría de biocapa u otros ensayos conocidos en la técnica.

Tabla 2

Molécula de adhesión	SEQ ID NO:	Secuencia	Inicio de la porción extracelular	Fin de la porción extracelular.
CD58	1	MVAGSDAGRALGVLSVCLLHCFGFISCFSSQQIY GVVYGNVTFHVP SNVPLKEVLWKKQKDKVAELE NSEFRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESPNTDTMKFFLYVLESLPSPTLTALCALTNG SIEVQCMIPHEHYN SHRGLIMYSWDCPMEQCKRN STSIYFKMENDLPQKIQTLSNPLFNTTSSIILTTCI PSSGHSRHRYPALIPPLAVITTCIVLYMNGILKCDR KPDRTNSN	29	215

Tabla 3

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:	Región
Dominio extracelular CD80	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV EELAQTRIYWQKE KKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILA LRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKA DFPTPSISDFEIP TSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLE NGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTTNH SFMCLIKYGH LRVNQTFNWNTTKQEHFPDN	134	Val35 - Asn242
Dominio extracelular	APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFW QDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMGR TSFDS	135	Ala24 - Pro247

CD86	SWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMN SELSVLANFSQPEIVPISNITENVYINLTCSSIHGYP EPKKMSVLLRTKNSTIEYDGVMMQKSQDNVTELYD VSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIEL EDPQPPPDHIP		
Dominio extracelular CD58	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDK VAELENSEFRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSS DEDEYEMESPNTDTMKFFLYV	136	Phe29 - Val120

[0283] En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora y/o de adhesión está unida a un dominio transmembrana. En algunas formas de realización, el dominio transmembrana puede ser el dominio transmembrana de CD8, una cadena alfa, beta o zeta de un receptor de células T., CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1 BB (CD137), 4-1 BBL, GITR, CD40, BAFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRFI), CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R a, 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, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, and/or NKG2C.

[0284] Sin querer estar limitado por la teoría, la reducción de las uniones extrañas (es decir, entre una molécula de adhesión y un dominio transmembrana) en el ácido nucleico extraño incorporado a una partícula lentiviral puede reducir la inmunogenicidad de un sujeto a una partícula lentiviral. Por consiguiente, en algunas formas de realización, el dominio transmembrana del polipéptido de fusión multidominio se deriva de la misma proteína que el dominio proximal a la membrana. Por ejemplo, el MDF puede incluir un fragmento de CD56 que incluya tanto el dominio extracelular de CD56 como el dominio transmembrana de CD56, por ejemplo, como una secuencia polipeptídica contigua. En una variante, este fragmento de CD56 incluye un enlazador u otra inserción entre el dominio extracelular de CD56 y el dominio transmembrana de CD56. Como otro ejemplo, el MDF puede incluir un fragmento de CD80 o CD86 que incluye el dominio transmembrana de CD80 o CD86, respectivamente, como una secuencia polipeptídica contigua, o en una variante, una secuencia con un enlazador u otra inserción entre dichos dos dominios.

[0285] Por ejemplo, en algunas formas de realización, los dominios coestimuladores y transmembrana se derivan de CD80 y los dominios aparecen en serie como lo harían en la proteína endógena (es decir, como una secuencia única). En algunas formas de realización en las que los dominios coestimuladores y/o de adhesión están comprendidos dentro de una molécula de fusión, puede haber múltiples dominios extracelulares. Por ejemplo, una molécula de fusión como la descrita aquí puede comprender un dominio de unión del CD58 y un dominio de unión del CD80. En tal ejemplo, el dominio CD80 puede ser el más proximal a la membrana y, por lo tanto, la molécula de fusión comprendería tanto los dominios de unión como los transmembrana del CD80 tal como aparecen en la proteína endógena.

[0286] En algunas formas de realización, la molécula de adhesión es CD58. CD58 también se conoce como antígeno 3 asociado a la función linfocitaria (LFA-3). CD58 se une a CD2 (LFA-2) en las células T. La parte extracelular de CD58 son residuos 29-215 of SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 10):
 FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVAELENSEFRAFSSFKNRVYLDTVS
 GSLTIYNLTSSDEDEYEMESPNITDTMKFFLYVLESLPSPTLTCALTNGSIEVQCMIPHY
 NSHRGLIMYSWDCPMEQCKRNSTSIYFKMENDLPQKIQCTLSNPLFNTTSSIILTTCIPSS
 GHSRHR (SEQ ID NO: 10)

[0287] En algunas formas de realización, la secuencia polipeptídica de CD58 comparte al menos 50 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 248:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVAELENSEFRAFSSFKNRVYLDTVS
 GSLTIYNLTSSDEDEYEMESPNITDTMKFFLYVLESL (SEQ ID NO: 248)

[0288] La estructura cristalina del CD58 se describe en Ikemizu et al. PNAS USA 96(8):4289-94 (1999). La parte extracelular del CD58 tiene un dominio de unión al ligando y un segundo dominio extracelular. En algunas formas de realización, el dominio de unión al ligando puede utilizarse como fragmento funcional del CD58, es decir, sin el segundo dominio extracelular.

[0289] En algunas formas de realización, la molécula de adhesión (o la proteína de fusión) comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 1 o 10, o una secuencia que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 o 10. En algunas formas de realización, la molécula de adhesión (o la proteína de fusión) comprende una secuencia que tiene menos del 75 %, menos del 80 %, menos del 85 %,

menos del 90 %, menos del 91 %, menos del 92 %, menos del 93 %, menos del 94 %, menos del 95 %, menos del 96 %, menos del 97 %, menos del 98 %, menos del 99 % o menos del 100 % de identidad con SEQ ID NO: 1 o 10. La molécula de adhesión puede estar codificada por un polinucleótido (por ejemplo, un polinucleótido de ADN o ARN).

[0290] La molécula de adhesión puede estar codificada por la secuencia polinucleotídica de CD58, SEQ ID NO: 11, o por una subsecuencia que codifica la porción extracelular o un fragmento funcional. SEQ ID NO: 11 (5' a 3'):
ATGGTTGCTGGGAGCGACGCGGGGCGGGCCCTGGGGGTCCTCAGCGTGGTCTGC
CTGCTGCACTGCTTTGGTTTCATCAGCTGTTTTTCCCAACAAATATATGGTGTGTGT
ATGGGAATGTAACCTTTCCATGTACCAAGCAATGTGCCTTTAAAAGAGGTCCTATGGA
AAAAACAAAAGGATAAAGTTGCAGAACTGGAAAATTCTGAGTTCAGAGCTTTCTCATC
TTTTAAAAATAGGGTTTATTTAGACACTGTGTCAGGTAGCCTCACTATCTACAACTTA
ACATCATCAGATGAAGATGAGTATGAAATGGAATCGCCAAATATTACTGATACCATGA
AGTTCTTTCTTTATGTGCTTGAGTCTCTTCCATCTCCACACTAACTTGTGCATTGAC
TAATGGAAGCATTGAAGTCCAATGCATGATACCAGAGCATTACAACAGCCATCGAGG
ACTTATAATGTACTCATGGGATTGTCCTATGGAGCAATGTAAACGTAACCTCAACCAGT
ATATATTTTAAGATGGAAAATGATCTTCCACAAAAAATACAGTGTACTCTTAGCAATCC
ATTATTTAATACAACATCATCAATCATTTTGACAACCTGTATCCCAAGCAGCGGTCAT
TCAAGACACAGATATGCACTTATACCCATACCATTAGCAGTAATTACAACATGTATTG
TGCTGTATATGAATGGTATTCTGAAATGTGACAGAAAACCAGACAGAACCAACTCCA
AT.

[0291] La secuencia de polinucleótidos puede variarse mediante la optimización de codones u otros métodos para generar secuencias de polinucleótidos que tengan al menos 50 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con SEQ ID NO: 11, o una subsecuencia adecuada, que puede utilizarse para expresar la molécula de adhesión.

[0292] Se apreciará que se pueden utilizar otras variantes de CD58. Por ejemplo, se pueden identificar homólogos de CD58 de otras especies (ratones, simios, caballos, etc.) y probarse para su uso en la transducción de células diana humanas o no humanas. Se espera que al menos algunos homólogos no humanos conserven la función de molécula de adhesión cuando se utilicen con células diana humanas.

[0293] Otras moléculas de adhesión útiles en la práctica de la presente invención pueden incluir cualquier molécula que se una específicamente a CD2, LFA-1 o DNAM-1. Por ejemplo, la molécula de adhesión puede ser una molécula que comprenda un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específico de CD2, LFA-1 o DNAM-1.

[0294] En algunas formas de realización, la molécula de adhesión se une a CD2. CD2 también se conoce como T11, LFA-2 y receptor de roseta eritrocitaria. En su estado nativo, CD2 es una proteína de superficie expresada en linfocitos T y células NK. CD2 es un ligando natural para CD58. Además de realizar funciones de adhesión, la unión de CD2 por CD58 proporciona una señal coestimuladora que puede mejorar la activación y las funciones efectoras. En algunas formas de realización, la partícula comprende una molécula de adhesión que se une a CD2, que puede ser CD58 o un fragmento del mismo. En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende un anticuerpo, un anticuerpo de dominio único, un fragmento de anticuerpo y/o un nanocuerpo específico para CD2.

[0295] La descripción anterior de CD58 y sus derivados como molécula de adhesión y CD2 como molécula cognada puede extrapolarse a las demás moléculas de adhesión descritas en el presente documento. La molécula de adhesión (o la proteína de fusión) puede comprender cualquier secuencia polipeptídica de la tabla 2, una parte extracelular de la misma, un fragmento funcional de la misma o una secuencia que tenga al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad con una secuencia de la tabla 2, a una parte extracelular de la misma o a un fragmento funcional de la misma.

Moléculas coestimuladoras

[0296] En la presente memoria se describen, en algunas formas de realización, moléculas coestimuladoras. La molécula coestimuladora puede incluirse como parte de una molécula de fusión. La molécula coestimuladora puede incluirse como parte de una partícula (por ejemplo, mostrada en la superficie de una partícula).

[0297] La molécula de fusión que se muestra en la partícula puede incluir una molécula coestimuladora. Sin embargo, en algunas formas de realización, la molécula de fusión no incluye una molécula coestimuladora. La partícula puede mostrar una molécula coestimuladora como una molécula separada en la superficie de la partícula, o la partícula puede carecer de cualquier molécula coestimuladora. La molécula coestimuladora puede ser una proteína, denominada en el presente documento “proteína coestimuladora”.

[0298] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “molécula coestimuladora” se refiere a una molécula capaz de proporcionar una señal coestimuladora a las células diana, distinta de una molécula de adhesión tal como se define en el presente documento. En un ejemplo no limitativo, las interacciones entre CD58 y CD2 también pueden proporcionar una señal activadora o coestimuladora. En la biología de las células T, la unión del receptor de células T por un antígeno puede

proporcionar la señal estimuladora primaria a la célula. Las llamadas señales coestimuladoras son proporcionadas por moléculas accesorias. Un ejemplo de señal coestimuladora es la señal proporcionada por la unión de CD28 en las células T por un ligando. Algunos ejemplos de ligandos de CD28 incluyen CD80 y CD86.

[0299] Las moléculas coestimuladoras ilustrativas incluyen, entre otras, CD80 o CD86. Cada una de las anteriores puede emplearse como molécula coestimuladora en forma de proteína completa, dominio extracelular o fragmento funcional.

[0300] Las secuencias polipeptídicas de moléculas coestimuladoras ilustrativas se proporcionan en la Tabla 4, con las posiciones “inicio” y “fin” de la porción extracelular de cada una. En cada caso, la molécula coestimuladora puede comprender un polipéptido. al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % identidad secuencial con cualquier secuencia de la Tabla 4, o fragmentos funcionales de la misma. En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora comprende un polipéptido que tiene menos del 75 %, menos del 80 %, menos del 85 %, menos del 90 %, menos del 91 %, menos del 92 %, menos del 93 %, menos del 94 %, menos del 95 %, menos del 96 %, menos del 97 %, menos del 98 %, menos del 99 % o 100 % identidad secuencial con cualquier secuencia de la Tabla 4, o un fragmento funcional de la misma. Los fragmentos funcionales pueden ser o incluir cualquier porción de 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 o 600 aminoácidos que conserve la afinidad de unión con su molécula cognada, cuando se mide mediante ensayos de afinidad, como interferometría de biocapa u otros ensayos conocidos en la técnica.

Tabla 4

Molécula coestimuladora	SEQ ID NO:	Secuencia	inicio	fin
CD80	12	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIH VTKEVKEVATLSCGHNVSV EELAQTRIYWQKEKKMVL TMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEG TYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFPTPSISDF EIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTV SQDPETELYAVSSKLD FNMTTNH SFMCLIKYGH LRVN QTFNWNTTKQEHFPD NLLPSWAITLISVNGIFVICCLT YCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV	35	242
CD80	250	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV EELAQTRIYWQKEKK		

		MVLTMMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPS DEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFTPSI SDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAIN TTVSQDPETELYAVSSKLDFNMNTNHSFMCLIKYGH RVNQTFNWNTTKQEHFPDNLPSWAITLISVNGIFVIC CLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV		
CD86	13	MDPQCTMGLSNILFVMAFLLSGAAPLKIAYFNETAD LPCQFANSQNSLSSELVFWQDQENLVLNEVYLGKE KFDSVHSKYMGRSTFSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQ CIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANSQPEIVPISNITE NVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNSTIEYDGVMQ KSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTNMTIFCILETDKT RLLSSPFSIELEDPPPPDHIPWITAVLPTVIICVMVFC LILWKWKKKKRPRNSYKCGTNTMERESEQTKKREK IHIPERSDEAQRVFKSSKTSSCDKSDTCF	24	24 7

[0301] En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora es o incluye CD80. En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora es o incluye una molécula que se une a CD28. El CD80 se une al CD28. La parte extracelular del CD80 incluye los residuos 35-230 de la SEQ ID NO: 12, que incluye un dominio de tipo V similar a la Ig (SEQ ID NO: 25) y un dominio de tipo C2 similar a la Ig (SEQ ID NO: 26), cualquiera de los cuales o ambos pueden estar incluidos para formar la molécula coestimuladora.

[0302] VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMMSGDMNIWPEYK NRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVT (SEQ ID NO: 25)

[0303] PSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVS SKLDFNMNTNHSFMCLIKYGHRLVNQTFN (SEQ ID NO: 26)

[0304] La estructura cristalina del CD80 (también conocido como B7-1) se describe en Ikemizu et al. Immunity 12:51-60 (2000). La parte extracelular del CD80 tiene dos dominios, descritos con anterioridad. En algunas formas de realización, uno o ambos dominios pueden utilizarse como fragmento funcional del CD80.

[0305] En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora es o incluye CD86. El CD86 se une al CD28. La parte extracelular del CD86 incluye los residuos 33-225 de la SEQ ID NO: 13, que incluye un dominio de tipo V similar a la Ig (SEQ ID NO: 27) y un dominio de tipo C2 similar a la Ig (SEQ ID NO: 28), cualquiera de los cuales o ambos pueden estar incluidos para formar la molécula coestimuladora.

[0306] NETADLPCQFANSQNSLSSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMGR TSFSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELS (SEQ ID NO: 27)

[0307] NVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNSTIEYDGVMQKSQDNVTELYDVSISLSV
SFPDVTSNMTIFCILETDKT (SEQ ID NO: 28)

[0308] La estructura cristalina del CD86 (también conocido como B7-1) se describe en Schwartz et al. Nature 410: 604-608 (2001). La parte extracelular del CD86 tiene dos dominios, descritos con anterioridad. En algunas formas de realización, uno o ambos dominios pueden utilizarse como fragmento funcional del CD86.

[0309] Se apreciará que pueden utilizarse otras variantes de CD80 o CD86. Por ejemplo, pueden identificarse homólogos de CD80 o CD86 de otras especies (ratones, simios, caballos, etc.) y probarse para su uso en la transducción de células diana humanas o no humanas. Se espera que al menos algunos homólogos no humanos conserven la función de molécula coestimuladora cuando se utilicen con células diana humanas.

[0310] En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora (o la proteína de fusión) comprende la secuencia polipeptídica de una o más de las SEQ ID NO: 12-13 y 25-28, o una secuencia que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con uno o más de los números de secuencia SEQ ID NO: 12-13 y 25-28.

[0311] En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora CD80 comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 250, o una secuencia que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 250.

[0312] En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora (o la proteína de fusión) comprende una secuencia polipeptídica que tiene menos del 75 %, menos del 80 %, menos del 85 %, menos del 90 %, menos del 91 %, menos del 92 %, menos del 93 %, menos del 94 %, menos del 95 %, menos del 96 %, menos del 97 %, menos del 98 %, menos del 99 % o menos del 100 % de identidad con una o más de SEQ ID NO: 12-13 y 25-28. La molécula coestimuladora puede estar codificada por un polinucleótido (por ejemplo, un polinucleótido de ADN o ARN). La molécula coestimuladora puede estar codificada por la secuencia polinucleotídica de CD80 (SEQ ID NO: 29) o CD86 (SEQ ID NO: 30), o por una subsecuencia que codifique la parte extracelular o un fragmento funcional.

[0313] ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTC
AATTTCTTTTCAGCTCTTGCTGCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTTTCAGGTGTTATCC
ACGTGACCAAGGAAGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCCTGTGGTCACAATGTTTCT
GTTGAAGAGCTGGCACAACTCGCATCTACTGGCAAAAGGAGAAGAAAATGGTGCT
GACTATGATGTCTGGGGACATGAATATATGGCCCGAGTACAAGAACCGGACCATCTT

TGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCCATCTGACGAGGG
CACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTATGAAAAAGACGCTTTCAAGCGGGAACACCT
GGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCCTACACCTAGTATATCTGACTTT
GAAATTCCAACCTTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCTCAACCTCTGGAGGTTTTCCAG
AGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAGAATTAATGCCATCAACACAACAG
TTTCCCAAGATCCTGAACTGAGCTCTATGCTGTTAGCAGCAAACCTGGATTTCAATAT
GACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTCATCAAGTATGGACATTTAAGAGTGAATCA
GACCTTCAACTGGAATACAACCAAGCAAGAGCATTTTCCTGATAACCTGCTCCCATC
CTGGGCCATTACCTTAATCTCAGTAAATGGAATTTTTGTGATATGCTGCCTGACCTAC
TGCTTTGCCCCAAGATGCAGAGAGAGAAGGAGGAATGAGAGATTGAGAAGGGAAAG
TGACGCCCTGTA (SEQ ID NO: 29)

[0314] ATGGATCCCCAGTGCCTATGGGACTGAGTAACATTCTCTTTGTGATGGCCT
TCCTGCTCTCTGGTGCTGCTCCTCTGAAGATTCAAGCTTATTTCAATGAGACTGCAG
ACCTGCCATGCCAATTTGCAAACCTCTCAAACCAAAGCCTGAGTGAGCTAGTAGTAT
TTTGGCAGGACCAGGAAAACCTGGTTCTGAATGAGGTATACTTAGGCAAAGAGAAAT
TTGACAGTGTTCAATTCCAAGTATATGGGCCGCACAAGTTTTGATTCGGACAGTTGGA
CCCTGAGACTTCACAATCTTCAGATCAAGGACAAGGGCTTGTATCAATGTATCATCC
ATCACAAAAAGCCCACAGGAATGATTCGCATCCACCAGATGAACTCTGAACTGTCAG
TGCTTGCTAACTTCAGTCAACCTGAAATAGTACCAATTTCTAATATAACAGAAAATGT
GTACATAAATTTGACCTGCTCATCTATACACGGTTACCCAGAACCTAAGAAGATGAGT
GTTTTGCTAAGAACCAAGAACTCAACTATCGAGTATGATGGTGTTATGCAGAAATCTC
AAGATAATGTCACAGAACTGTACGACGTTTCCATCAGCTTGTCTGTTTCATTCCCTGA
TGTTACGAGCAATATGACCATCTTCTGTATTCTGGAACTGACAAGACGCGGCTTTTA
TCTTCACCTTTCTCTATAGAGCTTGAGGACCCTCAGCCTCCCCCAGACCACATTCCT
TGGATTACAGCTGTACTTCCAACAGTTATTATATGTGTGATGGTTTTCTGTCTAATTCT
ATGGAAATGGAAGAAGAAGAAGCGGCCTCGCAACTCTTATAAATGTGGAACCAACAC
AATGGAGAGGGAAGAGAGTGAACAGACCAAGAAAAGAGAAAAAATCCATATACCTG
AAAGGTCTGATGAAGCCCAGCGTGTTTTTAAAGTTCTGAAGACATCTTCATGCGACA
AAAGTGATACATGTTTT (SEQ ID NO: 30)

[0315] La secuencia de polinucleótidos puede variarse mediante la optimización de codones u otros métodos para generar secuencias de polinucleótidos que tengan al menos 50 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 29 o 30, o una secuencia posterior adecuada, que puede utilizarse para expresar la molécula coestimuladora.

[0316] La descripción anterior de CD80, CD86 y sus derivados como moléculas coestimuladoras y CD28 como molécula cognada puede extrapolarse a las demás moléculas coestimuladoras descritas en el presente documento, incluidas, entre otras, las enumeradas en la tabla 4. La molécula coestimuladora (o la proteína de fusión) puede comprender cualquier secuencia polipeptídica de la tabla 4, o una parte extracelular de la misma, o un fragmento funcional de la misma, o una secuencia que tenga al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad con una secuencia de la tabla 4, o una parte extracelular de la misma, o un fragmento funcional de la misma.

Moléculas activadoras

[0317] En la presente memoria se describen, en algunas formas de realización, moléculas de activación. La molécula de activación puede incluirse como parte de una molécula de fusión. La molécula de activación puede incluirse como parte de una partícula (por ejemplo, mostrada en la superficie de una partícula). Un ejemplo de molécula de activación puede incluir una molécula de unión al TCR. Una molécula de activación es, en general, una molécula que activa una célula inmunitaria con una señal de activación inmunitaria primaria.

[0318] La molécula de fusión mostrada en la partícula puede incluir una molécula de activación (por ejemplo, una molécula de unión al TCR) u otra subunidad que proporcione una señal de activación a una célula diana. Sin embargo, en algunas formas de realización, la molécula de fusión no incluye una molécula de unión al TCR u otra molécula de activación. La partícula puede mostrar una molécula de unión al TCR como una molécula separada en la superficie de la partícula, o la partícula puede carecer de cualquier molécula de unión al TCR. La molécula de unión al TCR puede ser una proteína, denominada en el presente documento “proteína de unión al TCR”. La molécula de activación puede ser o incluir una proteína de activación.

[0319] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “molécula de unión al TCR” se refiere a una molécula capaz de unirse directamente a la parte extracelular del receptor de células T (TCR) al entrar en contacto con uno o más componentes del TCR o al proporcionar de otro modo una señal de activación primaria o “señal 1” a una célula diana (por ejemplo, una célula T o una célula NK). La estructura del TCR, sus componentes y su función se describen en Sušac et al. Cell 185(17):3201-3213.e19 (2022). Algunos ejemplos de moléculas de unión al TCR pueden incluir un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno que se une específicamente al CD3 (un anticuerpo monoclonal anti-CD3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo). En algunas formas de realización, la molécula de activación comprende un anticuerpo, un anticuerpo

de dominio único, un fragmento de anticuerpo, un nanocuerpo u otra proteína de unión específica para CD3. Algunos anticuerpos ilustrativos son OKT3 (también conocido como Muromonab-CD3), orelizumab, teplizumab y visilizumab. Las regiones determinantes de la complementariedad de OKT3 son las siguientes:

[0320] CDRH1: GYTFTRY (SEQ ID NO. 48)

[0321] CDRH2: NPSRGY (SEQ ID NO. 49)

[0322] CDRH3: YYDDHYCLDY (SEQ ID NO. 50)

[0323] CDRL1: SASSSVSYMN (SEQ ID NO. 51)

[0324] CDRL2: DTSKLAS (SEQ ID NO. 52)

[0325] CDRL3: QQWSSNPFT (SEQ ID NO. 53)

[0326] La molécula activadora (por ejemplo, la molécula de unión al TCR) puede ser un fragmento variable de cadena única (scFv) que se presenta en la partícula unido a una región transmembrana o a un anclaje. Se puede utilizar OKT3 en formato scFv.

[0327] En algunas formas de realización, la molécula de activación (por ejemplo, la molécula de unión al TCR) es o incluye un scFv que comprende una secuencia polipeptídica al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idéntica con el anti-CD3 scFv de la SEQ ID NO: 31, que incluye un dominio variable ligero (VL) y un dominio variable pesado (VH) con un enlazador 3 × GGS:

[0328] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLA
SGVPSRFSGSGSGTDYFTISLQPEDATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRTSGGGG
SGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGL
EWIGYINPSRGYTNYNQVKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRLPEDTGVEFCARYYYDDHY
CLDYWGQGTPVTVSSAAAKP (SEQ ID NO: 31)

[0329] En algunas formas de realización, la molécula de activación (por ejemplo, la molécula de unión al TCR) es o incluye un scFv que comprende una secuencia polipeptídica al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idéntica con el anti-CD3 scFv de la SEQ ID NO: 249, que incluye un dominio variable ligero (VL) y un dominio variable pesado (VH) con un enlazador 3 × GGS:

[0330] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLA
SGVPSRFSGSGSGTDYFTISLQPEDATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRTSGGGG
SGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGL
EWIGYINPSRGYTNYNQVKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRLPEDTGVEFCARYYYDDHY
CLDYWGQGTPVTVSSA (SEQ ID NO: 249)

[0331] Las regiones determinantes de la complementariedad del scFv anti-CD3 de SEQ ID NO: 249 scFv son las siguientes:

[0332] CDRH1: RYTMH (SEQ ID NO: 54)

[0333] CDRH2: YINPSRGYTNYNQKVKD (SEQ ID NO: 55)

[0334] CDRH3: YYDDHYCLDY (SEQ ID NO: 56)

[0335] CDRL1: SASSSVSYMN (SEQ ID NO: 57)

[0336] CDRL2: DTSKLAGS (SEQ ID NO: 58)

[0337] CDRL3: QQWSSNPFT (SEQ ID NO: 59)

[0338] Otras moléculas y/o dominios de activación pueden comprender las regiones de unión de otras proteínas que se encuentran comúnmente en el complejo de activación supramolecular (SMAC) entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígenos. Por ejemplo, CD3, CD2, CD4, CD8, CD28, LFA-1, CD45, CD43, CD40, ICAM-1, CTLA-4, CD80, CD86, MHC, LFA-3 y CD40L son proteínas que pueden estar presentes en el SMAC. Las proteínas de fusión descritas en el presente documento pueden comprender partes de estas proteínas o dominios que se unen a estas proteínas. Por ejemplo, sin querer estar limitado por la teoría, las células T pueden expresar uno o ambos de CD4 y/o CD8, y las moléculas de fusión descritas en el presente documento pueden comprender dominios que se unen con CD4 y/o CD8, o con ambos.

[0339] Cuando las células distintas de las células T son el objetivo previsto de las partículas que comprenden una molécula de fusión según se describe en el presente documento, pueden ser más apropiados otros dominios de unión. Por ejemplo, las partículas dirigidas a las células NK pueden comprender dominios que se unen a proteínas que se encuentran en las células NK. En algunas formas de realización, estas proteínas incluyen CD2, CD16, NKp46, NKp30 y NKG2D. En algunas de estas formas de realización, las proteínas de fusión destinadas a dirigirse y/o activar las células NK pueden comprender dominios que se unen a CD2, CD16, NKp46, NKG2D, etc. Los dominios que se unen a NKG2D pueden derivarse de ligandos de NKG2D, incluyendo, pero sin limitación: MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 y ULBP6. En algunas formas de realización, las proteínas de fusión descritas en el presente documento comprenden un dominio CD58, un dominio que se une a NKG2D y, opcionalmente, un tercer dominio que potencia la activación de la célula NK diana.

[0340] La molécula de activación puede estar codificada por un polinucleótido (por ejemplo, un polinucleótido de ADN o ARN).

Molécula de fusión

[0341] En la presente memoria se describen, en algunas formas de realización, moléculas de fusión. La molécula de fusión puede incluir una molécula de adhesión, una molécula coestimuladora o una molécula de activación. La molécula de fusión puede

incluir una molécula de adhesión. La molécula de fusión puede incluir una molécula coestimuladora. La molécula de fusión puede incluir una molécula de activación. La molécula de fusión puede incluir una molécula de adhesión, una molécula coestimuladora y una molécula de activación. La molécula de fusión puede incluir una molécula de adhesión y una molécula de activación. La molécula de fusión puede incluir una molécula coestimuladora y una molécula de activación. La molécula de fusión puede ser o incluir una proteína de fusión. La molécula de fusión puede estar incluida como parte de una partícula. La molécula de fusión puede utilizarse en un método descrito en el presente documento.

[0342] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona una molécula de fusión que comprende una combinación de una molécula de adhesión, una molécula coestimuladora y una molécula de activación (por ejemplo, una molécula de unión al TCR), cada uno de cuyos componentes está unido directa o indirectamente a los demás componentes. En algunas formas de realización, la molécula de fusión comprende una molécula de adhesión, una molécula coestimuladora y una molécula de activación (por ejemplo, una molécula de unión al TCR). En algunas formas de realización, la molécula de fusión comprende una molécula de adhesión y una molécula coestimuladora, pero no una molécula de unión al TCR. En algunas formas de realización, la molécula de fusión comprende una molécula de adhesión y una molécula de activación (por ejemplo, una molécula de unión al TCR), pero no una molécula coestimuladora. La molécula de fusión puede comprender además una o más moléculas de adhesión, moléculas coestimuladoras o moléculas de activación adicionales (por ejemplo, moléculas de unión al TCR).

[0343] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “molécula de fusión” se refiere a cualquier molécula que tenga múltiples componentes unidos entre sí, directa o indirectamente, de forma covalente o no covalente. La molécula de fusión puede estar formada por varias proteínas. Cuando esas proteínas se unen entre sí en una sola molécula mediante enlaces peptídicos, la molécula de fusión se denomina “proteína de fusión”.

[0344] La molécula de fusión puede fabricarse utilizando diversos enlaces, incluidos enlaces químicos (covalentes) (por ejemplo, mediante química clic) o enlaces peptídicos. Cuando la molécula de fusión es una proteína de fusión, el enlazador entre cada componente de la proteína de fusión puede ser un péptido único unido (es decir, un péptido unido directamente de C a N en una cadena polipeptídica) o a través de un enlazador polipeptídico. Los enlazadores polipeptídicos ilustrativos pueden incluir, entre otros, los enlazadores glicina-serina, tales como GGSGGS, GSSGSS u otros.

[0345] En algunas formas de realización, la molécula de fusión es o incluye una proteína de fusión. La proteína de fusión puede comprender una proteína de adhesión, uno o más enlaces polipeptídicos y una parte coestimuladora. En algunas formas de realización, la proteína de fusión comprende una molécula de adhesión, una molécula coestimuladora y una molécula de activación.

[0346] En algunas formas de realización de la proteína de fusión, la molécula de adhesión es N-terminal a la molécula coestimuladora. En algunas formas de realización, la molécula de adhesión es N-terminal a la molécula de activación. En algunas formas de realización, la molécula de adhesión es C-terminal a la molécula coestimuladora. En algunas formas de realización, la molécula de adhesión es C-terminal a la molécula de activación.

[0347] En algunas formas de realización de la proteína de fusión, la molécula de activación es N-terminal a la molécula coestimuladora. En algunas formas de realización, la molécula de activación es N-terminal a la molécula de adhesión. En algunas formas de realización, la molécula de activación es C-terminal a la molécula coestimuladora. En algunas formas de realización, la molécula de activación es C-terminal a la molécula de adhesión.

[0348] En algunas formas de realización de la proteína de fusión, la molécula coestimuladora es N-terminal a la molécula de activación. En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora es N-terminal a la molécula de adhesión. En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora es C-terminal a la molécula de activación. En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora es C-terminal a la molécula de adhesión.

[0349] Algunas formas de realización de la proteína de fusión incluyen un enlazador. Algunas formas de realización incluyen múltiples enlazadores. En algunas formas de realización, un enlazador conecta directamente la molécula coestimuladora con la molécula de adhesión. En algunas formas de realización, un enlazador conecta directamente la molécula coestimuladora con la molécula de activación. En algunas formas de realización, un enlazador conecta directamente la molécula de adhesión con la molécula de activación.

[0350] En algunas formas de realización de la proteína de fusión, un extremo N-terminal de la molécula coestimuladora se yuxtapone (directamente o a través de un enlazador) con un extremo de la molécula de adhesión. En algunas formas de realización de la proteína de fusión, un extremo C-terminal de la molécula coestimuladora se yuxtapone (directamente o a través de un enlazador) con un extremo de la molécula de adhesión. En algunas formas de realización de la proteína de fusión, un extremo N-terminal de la molécula coestimuladora se yuxtapone (directamente o a través de un enlazador) con un

extremo de la molécula de activación. En algunas formas de realización de la proteína de fusión, un extremo C-terminal de la molécula coestimuladora se yuxtapone (directamente o a través de un enlazador) con un extremo de la molécula de activación.

[0351] En algunas formas de realización de la proteína de fusión, un extremo N-terminal de la molécula de activación se yuxtapone (directamente o a través de un enlazador) con un extremo de la molécula de adhesión. En algunas formas de realización de la proteína de fusión, un extremo C-terminal de la molécula de activación se yuxtapone (directamente o a través de un enlazador) con un extremo de la molécula de adhesión. En algunas formas de realización de la proteína de fusión, un extremo N terminal de la molécula de activación se yuxtapone (directamente o mediante un enlazador) con un extremo de la molécula coestimuladora. En algunas formas de realización de la proteína de fusión, un extremo C terminal de la molécula de activación se yuxtapone (directamente o mediante un enlazador) con un extremo de la molécula coestimuladora.

[0352] En algunas formas de realización de la proteína de fusión, un extremo N terminal de la molécula de adhesión se yuxtapone (directamente o a través de un enlazador) con un extremo de la molécula coestimuladora. En algunas formas de realización de la proteína de fusión, un extremo C terminal de la molécula de adhesión se yuxtapone (directamente o a través de un enlazador) con un extremo de la molécula coestimuladora. En algunas formas de realización de la proteína de fusión, un extremo N-terminal de la molécula de adhesión se yuxtapone (directamente o a través de un enlazador) con un extremo de la molécula de activación. En algunas formas de realización de la proteína de fusión, un extremo C-terminal de la molécula de adhesión se yuxtapone (directamente o a través de un enlazador) con un extremo de la molécula de activación. La proteína de fusión puede comprender, en cualquier orden, un CD80, una porción extracelular de CD80 o un fragmento funcional de CD80; un CD58, una porción extracelular de CD58 o un fragmento funcional de CD58; una molécula de activación (por ejemplo, una molécula de unión al TCR); y enlaces polipeptídicos.

[0353] La proteína de fusión puede comprender, en orden N-terminal a C-terminal, CD80, una porción extracelular de CD80 o un fragmento funcional de CD80; un enlazador polipeptídico; y CD58, una porción extracelular de CD58; o un fragmento funcional de CD58.

[0354] La proteína de fusión puede comprender, en orden N-terminal a C-terminal, CD58, una porción extracelular de CD58; o un fragmento funcional de CD58; un enlazador polipeptídico; y CD80, una porción extracelular de CD80, o un fragmento funcional de CD80.

[0355] La proteína de fusión puede comprender, en orden N-terminal a C-terminal, una molécula de activación (por ejemplo, una proteína de unión al TCR); un enlazador

polipeptídico; CD80, una porción extracelular de CD80 o un fragmento funcional de CD80; un enlazador polipeptídico; y CD58, una porción extracelular de CD58; o un fragmento funcional de CD58.

[0356] La proteína de fusión puede comprender, en orden N-terminal a C-terminal, CD80, una porción extracelular de CD80 o un fragmento funcional de CD80; un enlazador polipeptídico; CD58, una porción extracelular de CD58 o un fragmento funcional de CD58; un enlazador polipeptídico; y una molécula de activación (por ejemplo, una proteína de unión al TCR).

[0357] La proteína de fusión puede comprender, en orden N-terminal a C-terminal, una molécula de activación (por ejemplo, una proteína de unión al TCR); un enlazador polipeptídico; CD58, una porción extracelular de CD58; o un fragmento funcional de CD58; un enlazador polipeptídico; y CD80, una porción extracelular de CD80, o un fragmento funcional de CD80.

[0358] La proteína de fusión puede comprender, en orden N-terminal a C-terminal, CD58, una porción extracelular de CD58; o un fragmento funcional de CD58; un enlazador polipeptídico; CD80, una porción extracelular de CD80, o un fragmento funcional de CD80; un enlazador polipeptídico; y una molécula de activación (por ejemplo, una proteína de unión al TCR).

[0359] Una proteína de fusión ilustrativa comprende una región extracelular de CD58 y α -CD3 scFv fusionada al extremo N-terminal de un CD80 a través de un enlazador; esta construcción se denomina polipéptido de trifusión y/o “498”.

[0360] Una proteína de fusión ilustrativa comprende una región extracelular CD58 fusionada al extremo N-terminal de un CD80 a través de un enlazador; esta construcción se denomina polipéptido de bifusión y/o “455”. En esta construcción, un α CD3 scFv se expresa como un polipéptido separado en las células productoras.

[0361] En cada caso, el enlazador polipeptídico puede ser opcional. Se puede omitir enlazando directamente la molécula de proteína a la siguiente mediante un enlace peptídico. Aunque se pueden generar proteínas de fusión mediante síntesis química, las proteínas de fusión se producen expresando la proteína de fusión a partir de un único polinucleótido que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica toda la proteína de fusión. Los métodos para diseñar y clonar polinucleótidos son conocidos en la técnica.

[0362] La molécula de fusión puede estar codificada por un polinucleótido (por ejemplo, un polinucleótido de ADN o ARN). En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona polinucleótidos que codifican dichas proteínas de fusión. El polinucleótido puede ser un polinucleótido aislado, o puede formar parte de un vector (por ejemplo, un plásmido) o puede introducirse y propagarse en una célula huésped.

[0363] En la tabla 5 se proporcionan secuencias polipeptídicas de proteínas de fusión CD58+CD80+αCD3scFv triples ilustrativas. En cada caso, la proteína de fusión puede comprender un polipéptido con al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con cualquier secuencia de la tabla 5. En algunas formas de realización, la proteína de fusión puede comprender un polipéptido con menos del 75 %, menos del 80 %, menos del 85 %, menos del 90 %, menos del 91 %, menos del 92 %, menos del 93 %, menos del 94 %, menos del 95 %, menos del 99 % o menos del 100 % de identidad de secuencia con cualquier secuencia de la tabla 5. En cada caso, se muestra entre paréntesis un péptido señal opcional. El péptido señal se escinde durante la expresión de la secuencia. La identidad de secuencia con una secuencia de referencia se determina sin los residuos opcionales. En la Figura 27B se proporcionan diagramas de cada fusión.

Tabla 5

Proteína de fusión	SEQ ID NO:	Secuencia
#497	73	(MGVKVLFALICIAVAEA)DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCS ASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSG SGSGTDYFTISSLQPEDATYYCQQWSSNPFTFGGQTKL QITRTSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRS LRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGY TNYNQVKDRFTISRDNSTAFLLQMSLRPEDTGVYFCA RYYDDHYCLDYWGQGTPVTVSSAGSSGGSGGGGSGGG GSGGGGSFSQQIYGVVYGNVTFHVPSTVPLKEVLWKKQK DKVAELENSEFRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESPNITDTMKFFLYVLESLPSPTLTALTNLSIEVQC MPEHYNSHRGLIMYSWDCPMEQCKRNTSIYFKMENDLP QKIQCTLSNPLFNTTSSILTTCPSSGHSRHRGSGVIHVTKE VKEVATLSCGHNVSEELAQTIRYVWQKEKMKVLTMMSGD MNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYESVVLKYEK DAFKREHLAEVTLVKADFPTPSISDFEIPSTNIRRIICSTSG GFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDNFN MTTNHSFMCLIKYGHRLRVNQTFNWNTTKQEHFPDNLPSW AITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV
#498	33	(MVAGSDAGRALGVLSVCLLHCFGFISC)FSQQIYGVVYG NVTFHVPSTVPLKEVLWKKQKDKVAELENSEFRAFSSFKN

		RVYLDTVSGSLTIYNLTSSDEDEYEMESPNITDTMKFFLYVL ESLGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSSVSYMNW YQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTI SSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRTSGGGGS GGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYT FTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDR FTISRDNSKNTAFLQMDSLRLPEDTGVYFCARYYDDHYCLD YWGQGTPTVTVSSAGSSGGSGGGGSGGGGSGGGGSSGVI HVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTIRYWQKEKMKMLTM MSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYESV LKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFPSTPSISDFEIPSTNIRRIIC STSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSK LDFNMTTNHSFMCLIKYGHRLRVNQTFNWNNTTKQEHFPDNL LPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESV RPV
--	--	--

[0364] Las FIG. 34A-34C y 35A-35C incluyen ejemplos de secuencias de triple fusión de CD58, CD80 y CD3 scFV. Algunas formas de realización incluyen una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico en cualquiera de las figuras 34A-34C y 35A-35C, o cualquiera de las SEQ ID NO: 235-246, o con un fragmento o parte de la misma, tal como se identifica en las claves de las figuras. Algunas formas de realización incluyen una secuencia de ácido nucleico que tiene menos del menos del 75 %, menos del 80 %, menos del 85 %, menos del 90 %, menos del 91 %, menos del 92 %, menos del 93 %, menos del 94 %, menos del 95 %, menos del 99 % o menos del 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico en cualquiera de las figuras 34A-34C y 35A-35C, o cualquiera de las SEQ ID NO: 235-246, o con un fragmento o parte de la misma, tal como se identifica en las claves de las figuras. Algunas formas de realización incluyen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos en cualquiera de las FIG. 34A-34C y 35A-35C o cualquiera de las SEQ ID NO: 235-246, o con un fragmento o parte de la misma tal como se identifica en las claves de las figuras. Algunas formas de realización incluyen una secuencia de aminoácidos que tiene menos del menos del 75 %, menos del 80 %, menos del 85 %,

menos del 90 %, menos del 91 %, menos del 92 %, menos del 93 %, menos del 94 %, menos del 95 %, menos del 99 % o menos del 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos en cualquiera de las FIG. 34A-34C y 35A-35C o cualquiera de las SEQ ID NO: 235-246, o con un fragmento o parte de la misma tal como se identifica en las claves de las figuras.

Partículas

[0365] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona partículas de diversos tipos, incluyendo, pero sin limitación, partículas lentivirales (es decir, un virión), nanopartículas lipídicas (LNP), lipoplexos, liposomas y nanotransportadores. La partícula puede incluir una molécula de adhesión, una molécula coestimuladora, una molécula de activación o una combinación de las mismas. Cualquiera de la molécula de adhesión, la molécula coestimuladora o la molécula de activación puede incluirse en una molécula de fusión. La molécula de adhesión, la molécula coestimuladora, la molécula de activación o una combinación de las mismas pueden incluirse en una superficie de la partícula. La molécula de fusión puede incluirse en una superficie de la partícula.

[0366] La partícula puede ser una nanopartícula lipídica (LNP) o un nanotransportador de poli(beta-amino)ésteres (PBAE), ambos de los cuales han demostrado transducir células T cuando se administran a un sujeto in vivo o se ponen en contacto con células T ex vivo. Utilizando las composiciones y los métodos descritos en el presente documento, se puede aumentar la transducción de células T con LNP y nanotransportadores basados en PBAE.

[0367] En algunas formas de realización, la partícula es una partícula viral. En la técnica son conocidos métodos para generar vectores virales a partir de diversos tipos de virus. Entre los tipos ejemplares de partículas virales que pueden diseñarse de forma recombinante como vehículos de administración se incluyen los retrovirus, los lentivirus (por ejemplo, el VIH y sus derivados y el VIS), los virus adenoasociados, los adenovirus, los retrovirus MMLV, los retrovirus MSCV, los baculovirus, los virus de la estomatitis vesicular, los virus del herpes simple y los virus de la vacuna. Algunos ejemplos son las partículas de virus adenoasociados (AAV) utilizadas para la terapia génica. En una forma de realización preferida, la partícula es una partícula retroviral. En una forma de realización particularmente preferida, la partícula es una partícula lentiviral.

[0368] Las partículas lentivirales pueden fabricarse utilizando líneas celulares de envasado, tal como se describe en el documento WO 2016/139463, o utilizando un vector policistrónico, tal como se describe en la publicación internacional de patente N.º WO 2020/106992 A1. Cada uno de los anteriores describe específicamente métodos para fabricar partículas lentivirales. Sus divulgaciones se incorporan aquí como

referencia. Pueden ser útiles muchos otros métodos para fabricar partículas virales, incluidas las partículas lentivirales.

[0369] Los retrovirus, un grupo que incluye los lentivirus, son virus envueltos. Las moléculas de fusión descritas en el presente documento pueden mostrarse en dichos virus envueltos mediante la expresión de la molécula de fusión, o sus diversos componentes, en una célula huésped bajo el control de un promotor (o promotores) adecuado. Cada componente puede incluir una secuencia de señal para la secreción. Al menos un componente debe incluir una región transmembrana o una secuencia de anclaje (como la secuencia de señal C-terminal que dirige la unión de un anclaje GPI). Los demás componentes pueden asociarse con el primer componente durante el proceso de secreción o después de la secreción. En el caso de proteínas de fusión únicas, es posible que solo se requiera una región transmembrana o una secuencia de anclaje, aunque los expertos en la técnica pueden prever y emplear múltiples regiones transmembranas o secuencias de anclaje. En algunas formas de realización, la molécula de fusión es una proteína de fusión que comprende una región transmembrana C-terminal, expresada a partir de un polinucleótido que codifica un péptido señal N-terminal. El péptido señal puede escindirse durante la expresión de la proteína en la superficie celular de la célula productora, dejando una proteína de fusión unida a la membrana sin la secuencia de señal. A continuación, la partícula lentiviral puede formarse cuando un virión brota de la superficie de la célula productora, incorporando como envoltura porciones de la membrana celular que incluyen una o más copias de la proteína de fusión.

[0370] Las partículas lentivirales generalmente empaquetan un genoma vectorial y, de forma incidental o intencionada, pueden empaquetar otras moléculas presentes en la célula productora. El genoma vectorial puede ser un genoma vectorial artificial diseñado para codificar una proteína o un polinucleótido heterólogo.

[0371] Las partículas lentivirales pueden contener elementos genéticos estructurales y/o funcionales que proceden principalmente de un virus. Las partículas lentivirales se caracterizan por la fuente predominante de material genético o estructural en la partícula lentiviral. Por lo tanto, el término “partícula retroviral” se refiere a una partícula viral que contiene proteínas estructurales y elementos del genoma vectorial, principalmente de un retrovirus. Del mismo modo, el término “partícula lentiviral” se refiere a una partícula viral que contiene proteínas estructurales y elementos del genoma vectorial, principalmente de un lentivirus. Para empaquetar su genoma vectorial, una partícula lentiviral puede requerir, por lo general, al menos una copia de las repeticiones terminales largas (LTR) que flanquean un genoma vectorial lentiviral nativo, o variantes funcionales del mismo.

[0372] En algunas formas de realización, una partícula viral comprende una glicoproteína viral. En algunas formas de realización, la partícula viral comprende una glicoproteína viral diferente de la glicoproteína viral nativa. Cuando la glicoproteína viral es heteróloga al genoma del vector, la partícula viral se denomina partícula viral “pseudotipada”. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la partícula viral se deriva del VIH, que normalmente incluye la glicoproteína gp120. Sin embargo, estas partículas basadas en el VIH pueden ser “pseudotipadas” y, en lugar de expresar su glicoproteína nativa, expresan una glicoproteína de un virus diferente. Por ejemplo, la glicoproteína viral puede ser una parte de RD114 o una de sus variantes, VSV-G, el virus de la leucemia del gibbon (GALV), la glicoproteína de la envoltura anfotrópica, la glicoproteína de la envoltura del sarampión o la glicoproteína de la envoltura retroviral del babuino. En algunas formas de realización, la glicoproteína de la envoltura viral es una proteína G de la cepa Cocal (Cocal G) o una variante funcional de la misma. Entre las glicoproteínas virales ilustrativas se incluyen la proteína VSV G, la proteína Cocal G y variantes de las mismas. Las glicoproteínas virales ilustrativas pueden expresarse como una sola proteína o en múltiples subunidades o partes. La glucoproteína viral puede servir como ligando para los receptores de la superficie celular en una célula diana y, por lo tanto, promover la transducción o la célula diana. La glucoproteína viral puede modificarse genéticamente para que carezca de afinidad de unión al LDLR, por ejemplo, mediante mutación en las posiciones 47 (por ejemplo, K47Q) y/o 354 (por ejemplo, R354A). Esto puede denominarse una glicoproteína viral “ciega”. Se proporcionan variantes de envoltura ilustrativas, por ejemplo, en US 2020/0216502 A1, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad. Sorprendentemente, en algunas formas de realización, las moléculas de fusión descritas aquí pueden permitir el uso de una glicoproteína viral que, por sí sola, no provoca la transducción de la célula diana. Sin estar limitado por la teoría, se cree que la proteína de fusión puede servir como ligando para el receptor de la superficie celular, mientras que la glicoproteína viral conserva una función estructural, pero no una función como ligando para un receptor de la superficie celular.

[0373] En algunas formas de realización, la glicoproteína viral es una glicoproteína VSV-G que comprende una mutación en la posición 47. En algunas formas de realización, la glicoproteína viral es una glicoproteína VSV-G que comprende una mutación en la posición 354. En algunas formas de realización, la glicoproteína viral es una glicoproteína VSV-G que comprende una mutación K47Q. En algunas formas de realización, la glicoproteína viral es una glicoproteína VSV-G que comprende una mutación R354A. En algunas formas de realización, la glicoproteína viral es una glicoproteína VSV-G que comprende una mutación K47Q y una mutación R354A. En algunas formas de realización, la glicoproteína viral es una glicoproteína cocal que comprende una mutación

en la posición 47. En algunas formas de realización, la glicoproteína viral es una glicoproteína cocal que comprende una mutación en la posición 354. En algunas formas de realización, la glicoproteína viral es una glicoproteína cocal que comprende una mutación K47Q. En algunas formas de realización, la glicoproteína viral es una glicoproteína cocal que comprende una mutación R354A. En algunas formas de realización, la glicoproteína viral es una glicoproteína cocal que comprende una mutación K47Q y una mutación R354A.

[0374] La proteína Cocal G puede tener una secuencia polipeptídica con al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con la siguiente secuencia:

[0375] NFLLLTFIVLPLCSHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSSYHYCPSSSDQNWHNDLLGITMKVKMPKTHKAIQADGWMCHAAKWITTCDFRWYGPKYITHSIHSIQPTSEQCKESIKQTKQGTWMSPGFPPQNCGYATVTDSDVAVVVQATPHHVLVDEYTG EWIDSQFPNGKCETEECETVHNSTVWYSDYKVTGLCDATLVDTEITFFSEDGKKESIGKPNTGYRSNYFAYEKGDKVCKMNYCKHAGVRLPSGVWFEFVDQDVYAAAKLPECPVGATISAPTQTSVDVSLILDVERILDYSLCQETWSKIRSKQPVSPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRIDINDPIISKMVGKISGSQTERELWTEWFPYEGVEIGPNGILKTPTGYKFPLFMIGHGMLDSDLHKTSQAEVFEHPLAEAPKQLPEEETLFFGDTGISKNPVELIEGWFWSSWKSTVVTTFFFAIGVFILLYVVARIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMSRFRK (SEQ ID NO: 74).

[0376] La proteína Cocal G puede tener una secuencia polipeptídica con al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con la siguiente secuencia:

[0377] MNFLLLTIVLPLCSHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSSYHYCPSSSDQNWHNDLLGITMKVKMPKTHKAIQADGWMCHAAKWITTCDFRWYGPKYITHSIHSIQPTSEQCKESIKQTKQGTWMSPGFPPQNCGYATVTDSDVAVVVQATPHHVLVDEYTG EWIDSQFPNGKCETEECETVHNSTVWYSDYKVTGLCDATLVDTEITFFSEDGKKESIGKPNTGYRSNYFAYEKGDKVCKMNYCKHAGVRLPSGVWFEFVDQDVYAAAKLPECPVGATISAPTQTSVDVSLILDVERILDYSLCQETWSKIRSKQPVSPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRIDINDPIISKMVGKISGSQTERELWTEWFPYEGVEIGPNGILKTPTGYKFPLFMIGHGMLDSDLHKTSQAEVFEHPLAEAPKQLPEEETLFFGDTGISKNPVELIEGWFWSSWKSTVVTTFFFAIGVFILLYVVARIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMSRFRK (SEQ ID NO: 247)

[0378] Las partículas lentivirales ilustrativas y los métodos para fabricarlas se describen en Naldini et al. Science 272:263-7 (1996); Zufferey et al. J. Virol. 72:9873-9880 (1998); Dull et al. J. Virol. 72:8463-8471 (1998); Miyoshi et al. J. Virol. 72:8150-57 (1998); Patente US N.º 6.013.516; y Patente US N.º 5.994.136.

[0379] Los protocolos para producir virus recombinantes con defectos de replicación se proporcionan en W095/14785, W096/22378, patente US N.º 5.882.877, la patente US N.º 6.013.516, la patente US N.º 4.861.719, la patente US N.º 5.278.056 y WO94/19478.

[0380] Las partículas virales pueden evaluarse de diversas maneras, incluyendo, por ejemplo, la medición del número de copias del vector (VCN) o los genomas del vector (vg) en una muestra de partículas virales mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) o la PCR digital en gotas (ddPCR), o la forma de realización de pruebas a las partículas virales en las células diana para medir un “título” del virus en, por ejemplo, unidades infecciosas por mililitro (UI/ml). Por ejemplo, el título puede evaluarse mediante un ensayo funcional realizado en la línea celular tumoral cultivada HT1080, tal como se describe en Humbert et al. *Molecular Therapy* 24:1237-1246 (2016). Cuando el título se evalúa en una línea celular cultivada que se divide continuamente, la estimulación puede ser innecesaria y, por lo tanto, el título medido puede no verse influido por la ingeniería de superficie de la partícula retroviral. En Gaererts et al. *BMC Biotechnol.* 6:34 (2006) se describen otros métodos para evaluar la eficacia de los sistemas de vectores retrovirales.

Cargas útiles

[0381] La partícula puede utilizarse para administrar una carga útil. El término “carga útil” se refiere a cualquier molécula o combinación de moléculas cuya administración a una célula diana sea deseable. Se pueden administrar diversas cargas útiles utilizando las partículas deseadas en la presente invención, incluyendo, pero sin limitación, moléculas pequeñas, polinucleótidos y proteínas. Cuando la célula diana seleccionada es una célula T, las partículas de la presente invención pueden utilizarse para administrar un agente terapéutico dirigido a las células T, a células T modificadas genéticamente, o para administrar un polinucleótido que codifica una proteína de interés para la célula T. De manera similar, las partículas descritas en la presente invención pueden utilizarse para administrar cargas útiles a las células NK.

[0382] La carga útil puede ser un polinucleótido, como un polinucleótido cuya secuencia codifica una proteína o un ácido nucleico no codificante (por ejemplo, shARN, microARN o siARN). El polinucleótido puede ser un ARN, como un ARN mensajero (ARNm) o el genoma vector de un virus ARN. Puede ser un ADN, como el genoma vector de un virus ADN.

[0383] La carga útil puede ser un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En el presente documento se describen CAR ilustrativos y polinucleótidos que los codifican. Los CAR útiles en la presente divulgación también se proporcionan en las patentes US Nros. 7.741.465; 9.856.322 y 8.399.964.

[0384] En algunas formas de realización, el CAR es un CAR que se une específicamente al CD19. Las terapias CAR T dirigidas al CD19 han sido aprobadas por la FDA e incluyen YESCARTA, TECARTUS, KYMRIA Y BREYANZI. Los CAR dirigidos contra el CD19 se describen, por ejemplo, en la publicación de patente US N.º 20160152723 y en las patentes US Nros. 10.736.918, 10.357.514 y 7.446.190.

[0385] La carga útil puede comprender un polinucleótido cuya secuencia codifica un receptor de citoquina inducible por moléculas pequeñas, como un receptor de superficie celular activado por rapamicina (RACR). Los receptores de citoquina inducibles por moléculas pequeñas se describen, por ejemplo, en la publicación de patente US N.º 2020/0123224.

[0386] Un inserto de polinucleótido ilustrativo para una partícula es SEQ ID NO: 76:

```
GCCACCATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCA
CGCCGCCAGGCCGGATGTCGTGATGACCCAGACCCCCCTCAGCCTCCCAGTGTCC
CTCGGTGACCAGGCTTCTATTAGTTGCAGATCCAGCCAGTCCCTCGTGCACTCTAAC
GGTAATACCTACCTGAGATGGTATCTCCAGAAGCCCGGACAGAGCCCTAAGGTGCT
GATCTACAAAGTCTCCAACCGGGTGTCTGGAGTCCCTGACCGCTTCTCAGGGAGCG
GTTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAACCGGGTGGAGGCCGAAGACCTCGG
CGTCTATTTCTGCTCTCAGAGTACACATGTGCCCTGGACCTTCGGCGGAGGGACCA
AGCTGGAGATCAAAAGCTCCGCAGACGATGCCAAGAAAGATGCCGCTAAGAAAGAC
GATGCTAAGAAAGACGATGCAAAGAAAGACGGTGGCGTGAAGCTGGATGAAACCGG
AGGAGGTCTCGTCCAGCCAGGAGGAGCCATGAAGCTGAGTTGCGTGACCAGCGGA
TTCACCTTTGGGCACTACTGGATGAACTGGGTGCGACAGTCCCCAGAGAAGGGGCT
CGAATGGGTGCTCAGTTCAGGAACAAACCCTACAATTATGAGACATACTATTCAGA
CAGCGTGAAGGGCAGGTTTACTATCAGTAGAGACGATTCCAAATCTAGCGTGTACCT
GCAGATGAACAATCTCAGGGTCGAAGATACAGGCATCTACTATTGCACAGGGGCAT
CCTATGGTATGGAGTATCTCGGTCAGGGGACAAGCGTCACAGTCAGTTTCGTGCCG
GTCTTCCTGCCAGCGAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGG
CGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGC
GGCGGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATC
TGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCT
TACTGCAACCACAGGAACCGTTTCTCTGTTGTTAAACGGGGCAGAAAGAACTCCT
GTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGC
TGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTT
CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC
GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCG
GGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTAC
AATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGG
```

CGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCC
ACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA (SEQ
ID NO: 76)

[0387] En algunas formas de realización, el CAR puede estar codificado por una secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido señal para indicar el transporte del CAR en la célula. Se entiende que, normalmente, el péptido señal se elimina de la proteína.

[0388] Una secuencia de aminoácidos CAR ilustrativa sin péptido señal puede comprender SEQ ID NO: 77:

DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVLIIYKVSNR
VSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKSSADDA
KKDAAKKDDAKKDDAKKDDGGVKLDETGGGLVQPGGAMKLSCVTSGFTFGHYWMNWV
RQSPEKGLEWVAQFRNKPYNYYETYSVSKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDTGI
YYCTGASYGMEYLGQGSVTVSFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC
RPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRFVVKRGRKKLLYI
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN
LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 77)

[0389] Una secuencia de aminoácidos ilustrativa del péptido señal CAR puede comprender la SEQ ID NO: 78:

MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 78)

[0390]

[0391] Un inserto polinucleótido ilustrativo para una partícula es SEQ ID NO: 81:

[0392] CTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCTCACCCAGCCTTT
CTGCTGATCCCCTCCGTGCTGACCCAGCCTAGCTCCGTGTCTGCCGCACCAGGACA
GAAGGTGACAATCAGCTGTTCCGGCTCTACCAGCAACATCGGCAACAATTACGTGA
GCTGGTACCAGCAGCACCCCTGGCAAGGCCCAAAGCTGATGATCTACGACGTGTCC
AAGAGGCCATCTGGAGTGCCTGATCGGTTCTCCGGCTCTAAGAGCGGCAATTCCGC
CTCTCTGGACATCAGCGGACTGCAGTCCGAGGACGAGGCAGATTACTATTGCGCCG
CCTGGGACGATAGCCTGTCCGAGTTTCTGTTCCGGCACCGGCACAAAGCTGACCGTG
CTGGGCTCTACAAGCGGATCCGGCAAGCCAGGATCTGGAGAGGGCAGCACAAAGG
GACAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAAACCTGGTGCAGCCAGGAGGCTCCCT
GCGCCTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTTACCTTCGGCTCTTTTAGCATGTCCTGGG
TGCGCCAGGCACCTGGAGGAGGACTGGAGTGGGTGGCCGGCCTGAGCGCCCGGT
CTAGCCTGACACACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACCATCTCCCGGGAT
AACGCCAAGAATAGCGTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGCGGGTGGAGGACACAGC
CGTGTACTATTGCGCCAGGCGCTCCTATGATTCTCTGGCTACTGGGGCCACTTTTA

CTCTTATATGGACGTGTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGAGCTCCACCACCA
CACCTGCTCCTAGACCACCTACACCCGCTCCTACCATCGCCAGCCAGCCTCTGTCT
CTGAGACCTGAGGCCTGTAGACCTGCCGCTGGAGGCGCTGTGCACACCAGAGGAC
TGGATTTCGCCTGCGACATCTACATCTGGGCTCCTCTGGCTGGAACATGCGGCGTG
CTGCTCCTGAGCCTGGTGATCACACTGTACTGCAAGCGCGGCCGGAAGAAGCTGCT
CTACATCTTTAAGCAGCCATTTCATGCGCCCCGTGCAGACCACACAGGAGGAGGACG
GCTGCTCCTGTTCGTTTCCAGAGGAGGAGGAGGGAGGATGTGAGCTGAGAGTGAA
GTTCTCTAGGAGCGCCGATGCCCTGCCTATCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTACA
ACGAGCTGAATCTGGGCCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGG
AAGAGACCCAGAGATGGGAGGCAAGCCTCGGAGAAAGAACCCACAGGAGGGCCTG
TATAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATCGGCATGAA
GGGAGAGAGGCGCCGGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTATCAGGGCCTGAGCAC
CGCCACAAAGGACACATACGATGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCAAGGTGA

[0393] En diversas formas de realización, la partícula comprende un polinucleótido que tiene una secuencia polinucleotídica según una o más de las SEQ ID NO. 75-76 u 80-81, o una secuencia polinucleotídica similar a ella. La secuencia polinucleotídica puede codificar, y las células transducidas por la partícula pueden expresar, un CAR que tiene una secuencia polipeptídica según una o más de las SEQ ID NO: 14, 77, 79, o una secuencia polinucleotídica similar a ella. La secuencia polipeptídica puede comprender un dominio variable de inmunoglobulina humanizada.

[0394] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “similar” puede referirse a una secuencia de polinucleótidos o polipéptidos al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o al menos aproximadamente 99,5 % a una secuencia de referencia.

[0395] En algunas formas de realización, las partículas lentivirales de la presente divulgación comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica, en cualquier orden, en una transcripción policistrónica: un promotor, una proteína terapéutica (por ejemplo, CAR), opcionalmente un dominio FRB citosólico o una parte del mismo, y opcionalmente un polipéptido citoquina sintético (por ejemplo, RACR). En algunas formas de realización, la transcripción policistrónica comprende un promotor y un CAR. Los promotores ilustrativos incluyen, sin limitación, un promotor del citomegalovirus (CMV), un promotor CAG, un promotor SV40, un promotor SV40/CD43 y un promotor MND.

[0396] En algunas formas de realización, el promotor MND comprende una secuencia de ácido nucleico que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al

menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 118.

GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCT
GCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATA
TCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGAT
GCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCA
AGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTT
CTGTTTCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACC
GTCAGATCGCTAGC (SEQ ID NO: 118)

[0397] En algunas formas de realización, el promotor MND comprende una secuencia de ácido nucleico que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 172.

AATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGGATCAAGGTCAGGAACAGAGA
GACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCT
CAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTA
AGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCC
GCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTG
AAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCG
GCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGC (SEQ ID
NO: 172)

[0398] En algunas formas de realización, la secuencia de señal CSF2RA comprende una secuencia de ácido nucleico que comparte al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 173.

ATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCTCACCCAGCCTTCT
GCTGATCCCC (SEQ ID NO: 173)

[0399] La divulgación proporciona un constructo polinucleotídico que comprende una secuencia polinucleotídica contigua que codifica al menos dos receptores sintéticos y métodos para su uso. En algunas formas de realización, el constructo polinucleotídico es un constructo policistrónico que codifica un receptor de citoquina sintético, un receptor de antígeno quimérico sintético (CAR) y un FRB libremente difusible, en donde el receptor de citoquina responde a la unión de rapamicina. Ventajosamente, el FRB reduce los efectos inhibidores de la rapamicina sobre mTOR en células modificadas para expresar los constructos policistrónicos proporcionados en la presente. La expresión del FRB libremente difusible puede promover la activación y proliferación consistentes de las células modificadas.

[0400] En algunos aspectos, se proporciona un vector lentiviral que comprende cualquiera de los constructos policistrónicos descritos en el presente documento. En algunos aspectos, se proporciona una célula que comprende cualquiera de los vectores lentivirales descritos en el presente documento.

[0401] En algunos aspectos, se proporciona un método para transducir una célula que comprende poner en contacto una célula diana con cualquiera de los constructos policistrónicos descritas en el presente documento.

[0402] En algunos aspectos, se proporciona un método para expresar un receptor de antígeno quimérico y/o un receptor de citoquina sintético en una célula diana. En algunos aspectos, se proporciona una célula producida por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

[0403] En algunos aspectos, se proporciona un método para administrar a un sujeto cualquiera de las células descritas en el presente documento. En algunos aspectos, se proporciona un método para administrar a un sujeto cualquiera de los vectores lentivirales descritos en el presente documento.

[0404] Todas las publicaciones, incluidos los documentos de patentes, los artículos científicos y las bases de datos, a los que se hace referencia en esta solicitud se incorporan por referencia en su totalidad a todos los efectos en la misma medida que si cada publicación individual se incorporara por referencia de forma individual. Si una definición establecida en el presente documento es contraria o incompatible con una definición establecida en las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones que se incorporan aquí por referencia, la definición establecida en el presente documento prevalecerá sobre la definición incorporada aquí por referencia.

[0405] Los títulos de las secciones utilizados en el presente documento tienen únicamente fines organizativos y no deben interpretarse como una limitación del tema descrito.

Constructos policistrónicos

[0406] Se proporcionan aquí constructos policistrónicos que codifican una o más proteínas separadas. En algunas formas de realización, los constructos policistrónicos comprenden uno, dos, tres o cuatro casetes de expresión, cada uno de los cuales codifica una proteína separada. En algunas formas de realización, los constructos policistrónicos comprenden cuatro casetes de expresión, cada uno de los cuales codifica una proteína separada. En algunas formas de realización, los casetes de expresión están separados por enlaces escindibles.

[0407] En algunas formas de realización, los constructos policistrónicos proporcionados aquí comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una FRB. En algunas formas de realización, los constructos policistrónicos proporcionados aquí comprenden

una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas formas de realización, los constructos policistrónicos proporcionados aquí comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de citoquina sintética. En algunas formas de realización, el polipéptido de citoquina sintética comprende un polipéptido de cadena gamma de citoquina sintética y un polipéptido de cadena beta de citoquina sintética. En algunas formas de realización, la cadena gamma de citoquina sintética comprende la subunidad γ del receptor de interleuquina 2 (IL2RG). En algunas formas de realización, la cadena gamma de citoquina sintética comprende además FRB. En algunas formas de realización, la cadena beta de citoquina sintética comprende la subunidad β del receptor de interleuquina 2 (IL2RB). En algunas formas de realización, la cadena gamma de citoquina sintética comprende además FKBP12. En otras formas de realización, la cadena gamma de citoquina sintética comprende la subunidad γ del receptor de interleuquina 2 (IL2RG). En algunas formas de realización, la cadena gamma de citoquina sintética comprende además FKBP12. En algunas formas de realización, la cadena beta de citoquina sintética comprende la subunidad β del receptor de interleuquina 2 (IL2RB). En algunas formas de realización, la cadena beta de citoquina sintética comprende además FRB.

[0408] En algunas formas de realización, el constructo policistrónico proporcionado aquí comprende secuencias de nucleótidos que codifican un FRB, un polipéptido de citoquina sintética y un CAR.

[0409] En algunas formas de realización, el constructo policistrónico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica FRB, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de citoquina sintética y una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de citoquina sintética comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica FRB:IL2RG y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica FKBP12:IL2RB. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido citoquina sintético comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica FKBP12:IL2RG y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica FRB:IL2RB.

FRB citosólico

[0410] En algunas formas de realización, un casete de expresión del constructo policistrónico codifica un dominio FRB. El dominio FRB es un dominio de aproximadamente 270 pares de bases (pb) de la proteína quinasa mTOR. Puede expresarse en el citosol como una proteína soluble libremente difusible.

[0411] En algunas formas de realización, el primer casete de expresión en el constructo policistrónico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un FRB. En algunas

formas de realización, cuando se expresa el FRB, es una proteína soluble libremente difusible ("FRB libre").

[0412] En algunas de las formas de realización, el método incluye además la administración de un ligando no fisiológico al sujeto. En algunas formas de realización, el ligando no fisiológico es capaz de unirse al receptor de citoquina sintético e inducir la señalización de citoquina gamma en la célula. En algunas formas de realización, el ligando no fisiológico incluye rapamicina o un análogo de rapamicina.

[0413] En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el FRB es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 256, 257 o 258. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el FRB es al menos 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 256, 257 o 258. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el FRB comprende la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 256, 257 o 258.

[0414] En algunas formas de realización, el FRB comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 251, 252 o 260. En algunas formas de realización, el FRB comprende una secuencia de aminoácidos al menos 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 251, 252 o 260. En algunas formas de realización, el FRB comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 251, 252 o 260.

[0415] En algunas formas de realización, el complejo receptor de citoquina sintético comprende un polipéptido citosólico que se une al ligando o a un complejo que comprende el ligando.

[0416] Ventajosamente, el FRB citosólico confiere resistencia al efecto inmunosupresor del ligando no fisiológico (por ejemplo, rapamicina o rapalog).

Receptor sintético de citoquinas

[0417] En algunas formas de realización, un casete de expresión del constructo policistrónico codifica un receptor de citoquina sintético. Los receptores de citoquina sintéticos de la presente divulgación comprenden una cadena gamma sintética y una cadena beta sintética, cada una de las cuales comprende un dominio de dimerización. Los dominios de dimerización se dimerizan de forma controlable en presencia de un ligando no fisiológico, activando así la señalización del receptor de citoquina sintético.

[0418] El polipéptido de cadena gamma sintética comprende un primer dominio de dimerización, un primer dominio transmembrana y un dominio intracelular de la subunidad gamma del receptor de interleuquina-2 (IL-2RG). El dominio de dimerización

puede ser extracelular (N-terminal al dominio transmembrana) o intracelular (C-terminal al dominio transmembrana y N- o C-terminal al dominio intracelular IL-2G).

[0419] El polipéptido de cadena beta sintético comprende un segundo dominio de dimerización, un segundo dominio transmembrana y un dominio intracelular seleccionado entre un dominio intracelular de la subunidad beta del receptor de interleuquina-2 (IL-2RB), un dominio intracelular de la subunidad beta del receptor de interleuquina-7 (IL-7RB) o un dominio intracelular de la subunidad beta del receptor de interleuquina-21 (IL-21RB). El dominio de dimerización puede ser extracelular (N-terminal al dominio transmembrana) o intracelular (C-terminal al dominio transmembrana y N- o C-terminal al dominio intracelular IL-2RB o IL-7RB).

[0420] En algunas formas de realización, el constructo policistrónico proporcionado aquí comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican un receptor de citoquina sintético. En algunas formas de realización, la una o más secuencias de nucleótidos corresponden a uno o más casetes de expresión. En algunas formas de realización, el constructo de polinucleótidos proporcionado aquí comprende un casete de expresión que codifica IL2RG y un segundo casete de expresión que codifica IL2RB.

[0421] En algunas formas de realización, el polipéptido de cadena gamma sintético está codificado por una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal. En algunas formas de realización, el polipéptido de cadena beta sintético está codificado por una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal. Un experto en la técnica está familiarizado con los péptidos señal que pueden proporcionar una señal para transportar una proteína naciente en las células. Se puede emplear cualquiera de una variedad de péptidos señal.

[0422] En algunas formas de realización, el nucleótido que codifica el polipéptido de cadena gamma de citoquina sintética es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 261, 262 o 263. En algunas formas de realización, el nucleótido que codifica el polipéptido de la cadena gamma de la citoquina sintética es al menos 100 % idéntico a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 261, 262 o 263. En algunas formas de realización, el nucleótido que codifica el polipéptido de la cadena gamma de la citoquina sintética comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 261, 262 o 263.

[0423] En algunas formas de realización, el polipéptido de la cadena gamma de la citoquina sintética comprende la subunidad y del receptor de interleuquina 2 (IL2RG). En algunas formas de realización, el IL2RG comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 264 o 265. En algunas

formas de realización, el IL2RG comprende una secuencia de aminoácidos al menos 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 264 o 265. En algunas formas de realización, el IL2RG comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 264 o 265.

[0424] En algunas formas de realización, el segundo casete de expresión comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica FRB. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el FRB es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 257. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el FRB es al menos 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 257. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el FRB comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 257.

[0425] En algunas formas de realización, el FRB comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 252. En algunas formas de realización, el FRB comprende una secuencia de aminoácidos al menos 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 252. En algunas formas de realización, el FRB comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 252.

[0426] En algunas formas de realización, el segundo casete de expresión está optimizado para codones.

[0427] En algunas formas de realización, el segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 266. En algunas formas de realización, el segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótidos al menos 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 266. En algunas formas de realización, el segundo casete de expresión comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 266.

[0428] En algunas formas de realización, el segundo casete de expresión codifica una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 267. En algunas formas de realización, el segundo casete de expresión codifica una secuencia de aminoácidos al menos 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 267. En algunas formas de realización, el segundo casete de expresión codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 267.

[0429] En algunas formas de realización, el segundo casete de expresión comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica FKBP12. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica FKBP12 es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 268 o 269. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica FKBP12 es al menos 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 268 o 269. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica FKBP12 comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 268 o 269.

[0430] En algunas formas de realización, el FKBP12 comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 253. En algunas formas de realización, el FKBP12 comprende una secuencia de aminoácidos al menos 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 253. En algunas formas de realización, el FKBP12 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 253.

[0431] En algunas formas de realización, el nucleótido que codifica el polipéptido de la cadena beta de la citoquina sintética es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 270 o 271. En algunas formas de realización, el nucleótido que codifica el polipéptido de la cadena beta de la citoquina sintética es al menos 100 % idéntico a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 270 o 271. En algunas formas de realización, el nucleótido que codifica el polipéptido de la cadena beta de la citoquina sintética comprende la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 270 o 271.

[0432] En algunas formas de realización, el polipéptido de cadena beta de citoquina sintética comprende la subunidad β del receptor de interleuquina 2 (IL2RB).

[0433] En algunas formas de realización, el IL2RB comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 272 o 273. En algunas formas de realización, la IL2RB comprende una secuencia de aminoácidos al menos 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 272 o 273. En algunas formas de realización, el IL2RB comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 272 o 273.

[0434] En algunas formas de realización, el tercer casete de expresión comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica FKBP12.

[0435] En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica FKBP12 es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 268 o 269.

98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 274. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el FKBP12 es al menos 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 274. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el FKBP12 comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 274.

[0436] En algunas formas de realización, el FKBP12 comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 275. En algunas formas de realización, el FKBP12 comprende una secuencia de aminoácidos al menos 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 275. En algunas formas de realización, el FKBP12 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 275.

[0437] En algunas formas de realización, el tercer casete de expresión está optimizado para codones.

[0438] En algunas formas de realización, el tercer casete de expresión comprende una secuencia de nucleótidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 276. En algunas formas de realización, el tercer casete de expresión comprende una secuencia de nucleótidos al menos 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 276. En algunas formas de realización, el tercer casete de expresión comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 276.

[0439] En algunas formas de realización, el tercer casete de expresión codifica una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 277. En algunas formas de realización, el tercer casete de expresión codifica una secuencia de aminoácidos al menos 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 277. En algunas formas de realización, el tercer casete de expresión codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 277.

[0440] En algunas formas de realización, el tercer casete de expresión comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica FRB. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el FRB es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 257. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el FRB es al menos 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 257. En algunas formas de realización, la secuencia de

nucleótidos que codifica el FRB comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 257.

Dominio intracelular

[0441] En algunas formas de realización, el dominio de señalización intracelular de la primera proteína receptora transmembrana comprende un dominio de la subunidad gamma del receptor de interleuquina-2 (IL2Rg).

[0442] En algunas formas de realización, el receptor de citoquina sintético comprende una primera proteína receptora transmembrana que comprende un dominio intracelular IL-2RG, un primer dominio de dimerización, una segunda proteína receptora transmembrana que comprende un dominio intracelular IL-2RB y un segundo dominio de dimerización.

[0443] En algunas formas de realización, la cadena beta sintética comprende un dominio intracelular de la subunidad beta del receptor de interleuquina-2 (IL2RB). IL2RB también se conoce como IL15RB o CD122. Por lo tanto, cuando se hace referencia a él en el presente documento, IL2RB también puede significar IL15RB. Es decir, los términos se utilizan indistintamente en la presente divulgación.

[0444] En algunas formas de realización, el receptor de citoquina sintético comprende una primera proteína receptora transmembrana que comprende un dominio intracelular IL-2RG, un primer dominio de dimerización, una segunda proteína receptora transmembrana que comprende un dominio intracelular IL-7RB y un segundo dominio de dimerización.

[0445] En algunas formas de realización, la cadena beta sintética comprende un dominio intracelular de la subunidad beta del receptor de interleuquina-7 (IL7RB).

[0446] En algunas formas de realización, el receptor de citoquina sintético comprende una primera proteína receptora transmembrana que comprende un dominio intracelular IL-2RG, un primer dominio de dimerización, una segunda proteína receptora transmembrana que comprende un dominio intracelular IL-21RB y un segundo dominio de dimerización.

[0447] En algunas formas de realización, la cadena beta sintética comprende un dominio intracelular de la subunidad beta del receptor de interleuquina-21 (IL21RB).

Dominio de dimerización

[0448] Los dominios de dimerización pueden ser dominios de heterodimerización, incluyendo, pero sin limitación, la proteína de unión FK506 de 12 kD (FKBP) y un dominio de unión FKBP12-rapamicina (FRB), que se dimerizan en presencia de rapamicina o un rapalog.

[0449] Alternativamente, el primer dominio de dimerización y el segundo dominio de dimerización pueden ser una proteína de unión a FK506 de 12 kD (FKBP) y un dominio de calcineurina, que se dimerizan en presencia de FK506 o un análogo del mismo.

[0450] En algunas formas de realización, los dominios de dimerización son dominios de homodimerización seleccionados entre:

i) Proteína de unión a FK506 de 12 kD (FKBP);

ii) ciclofilina A (CypA); o

iii) girasa B (CyrB);

con los ligandos no fisiológicos correspondientes, que son, respectivamente

i) FK1012, AP1510, AP1903 o AP20187;

ii) ciclosporina A (CsA); o

iii) coumestricina o análogos de la misma.

[0451] En algunas formas de realización, los primeros y segundos dominios de dimerización de las proteínas receptoras transmembrana son un dominio FKBP y un dominio ciclofilina.

[0452] En algunas formas de realización, los primeros y segundos dominios de dimerización de las proteínas receptoras transmembrana son un dominio FKBP y un dominio dihidrofolato reductasa bacteriana (DHFR).

[0453] En algunas formas de realización, los primeros y segundos dominios de dimerización de las proteínas receptoras transmembrana son un dominio calcineurina y un dominio ciclofilina.

[0454] En algunas formas de realización, los primeros y segundos dominios de dimerización de las proteínas receptoras transmembrana son PYR1-like 1 (PYL1) y "abscisic acid insensitive 1" (ABI1).

Dominio transmembrana

[0455] El dominio transmembrana es la secuencia del receptor de citoquina sintético que se extiende a través de la membrana. El dominio transmembrana puede comprender una hélice alfa hidrofóbica. En algunas formas de realización, el dominio transmembrana es una proteína humana.

[0456] En algunas formas de realización, el dominio TM y el dominio de señalización intracelular proceden del mismo receptor de citoquina. En algunas formas de realización, el polipéptido de cadena gamma sintética contiene un dominio TM IL-2RG y un dominio intracelular IL-2RG. En algunas formas de realización, el polipéptido de cadena beta sintética contiene un dominio TM IL-2RB y un dominio intracelular IL-2RB. En algunas formas de realización, el polipéptido de cadena beta sintética contiene un dominio TM IL-7RB y un dominio intracelular IL-7RB. En algunas formas de realización, el polipéptido de cadena beta sintética contiene un dominio TM IL-21RB y un dominio intracelular IL-21RB.

[0457] En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos contiguos adicionales del ectodominio directamente adyacentes al dominio TM del receptor de citoquinas también pueden incluirse como parte de la secuencia polipeptídica de una cadena del receptor de citoquinas sintético. En algunas formas de realización, se incluyen 1-20 aminoácidos contiguos del ectodominio adyacentes al dominio TM del receptor de citoquinas como parte de la secuencia polipeptídica de una cadena del receptor de citoquinas sintético. La parte del ectodominio puede ser una secuencia contigua de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos directamente adyacentes (por ejemplo, N-terminales a) la secuencia TM.

[0458] En algunas formas de realización, el receptor de citoquina sintético es capaz de unirse al ligando no fisiológico rapamicina o un análogo de la rapamicina. En algunas formas de realización, el receptor de citoquina sintético responde al ligando no fisiológico rapamicina o a un análogo de la rapamicina, en donde la unión del ligando no fisiológico a los dominios de dimerización del receptor de citoquina sintético induce la señalización mediada por el receptor de citoquina en la célula, por ejemplo, a través de la vía JAK/STAT.

Constructos policistrónicos ilustrativos

[0459] En algunas formas de realización, el constructo policistrónico comprende, en orden de 5' a 3', una secuencia de nucleótidos que codifica FRB, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido citoquina sintético y una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido citoquina sintético comprende, en orden 5' a 3', una primera secuencia de nucleótidos que codifica FRB operativamente unida a IL2RG y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica FKBP12 operativamente unida a IL2RB. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido citoquina sintético comprende, en orden 5' a 3', una primera secuencia de nucleótidos que codifica FKBP12 unido de manera operativa a IL2RG y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica sFRB unido de manera operativa a IL2RB.

[0460] En algunas formas de realización, las partículas lentivirales de la presente divulgación comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica, en orden 5' a 3' en una transcripción policistrónica: promotor MND – FRB – [secuencia de señal T2A y ER] – RACRg – [secuencia de señal P2A y ER] – RACRb – [secuencia de señal P2A y hCSF2R] – CAR anti-CD19.

[0461] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende una secuencia de ácido nucleico T2A que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 278.

[0462] GAGGGCCGAGGCAGCCTGCTGACCTGCGGTGATGTGGAAGAAAACCCGGG
CCCC (SEQ ID NO: 278).

[0463] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende una secuencia de ácido nucleico de secuencia de señal ER que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 279.

[0464] ATGCCCTTGCCCGTGACCGCGTTGCTCCTGCCCTTGGCTCTACTGCTGCAC
GCCGCTAGACCC (SEQ ID NO: 279).

[0465] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende una secuencia de ácido nucleico P2A que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 280.

[0466] GCCACCAATTTTCAGCCTCCTGAAACAAGCCGGTGACGTTGAAGAGAACCCC
GGCCCC (SEQ ID NO: 280).

[0467] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende una secuencia de ácido nucleico de secuencia de señal ER que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 281.

[0468] ATGCCCCTGGGGTTGCTGTGGTTGGGACTCGCCCTCCTCGGCGCCCTGCAC
GCTCAAGCC (SEQ ID NO: 281).

[0469] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende una secuencia de ácido nucleico P2A que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 282.

[0470] GCAACAACTTTTCTCTGCTGAAGCAGGCCGGCGATGTGGAAGAAAACCCTG
GACCT (SEQ ID NO: 282).

[0471] En algunas formas de realización, las partículas lentivirales de la presente divulgación comprenden una secuencia de polinucleótidos que codifica, en orden 5' a 3' en una transcripción policistrónica:

- (a) un promotor MND;
- (b) un CAR;
- (c) un dominio FRB citosólico o una parte del mismo;
- (d) un receptor de superficie celular RACR; y
- (e) una secuencia WPRE.

[0472] En algunas formas de realización, las partículas lentivirales de la presente divulgación comprenden una secuencia de polinucleótidos que codifica, en orden 5' a 3':

- (a) un CAR;

- (b) un dominio FRB citosólico o una parte del mismo; y
- (c) un receptor de superficie celular RACR.

[0473] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende una secuencia de ácido nucleico que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 119.

[0474] GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGT TCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAG GATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCC AGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGC CCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCT CGCTTCTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGT GAACCGTCAGATCGCTAGC (SEQ ID NO: 119)

[0475] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende una secuencia polipeptídica que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 120.

[0476] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW YQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSVTVSSESKYGPPCPPCPMFVWLVVGGVLA CYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVK FRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGA TNFSLLKQAGDVEENPGPEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQ TLKETSFNQAYGRDLMEAEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKGSGATNF SLLKQAGDVEENPGPMPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPKRGQTCV VHYTGMLEDGKKFDSSRDNRNPKFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYA YGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGEGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYF WLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPCKGG ALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPETGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTA LLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTL KETSFNQAYGRDLMEAEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKGKDTIPWLG HLLVGLSGAFGFILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSLSSEHGGDVQKWLS SPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSALTSCFTNQGYF FFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSR DDLFFFSPSLLGGPSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPQLGPPTPGVPDL

VDFQPPPELVREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQ
ELQGQDPTHLV (SEQ ID NO: 120)

[0477] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende una secuencia de ácido nucleico que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 121.

[0478] En algunas formas de realización, las partículas lentivirales de la presente divulgación comprenden una secuencia de polinucleótidos que codifica, en orden 5' a 3' en una transcripción policistrónica:

- (a) un promotor MND;
- (b) un dominio FRB citosólico o una parte del mismo;
- (c) un receptor RACR de la superficie celular;
- (d) un CAR; y
- (e) una secuencia WPRE.

[0479] En algunas formas de realización, las partículas lentivirales de la presente divulgación comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica, en orden 5' a 3':

- (a) un dominio FRB citosólico o una parte del mismo;
- (b) un receptor RACR de la superficie celular; y
- (c) un CAR.

[0480] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende una secuencia polipeptídica que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 122.

[0481] MEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG
RDLMEAEQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKGSGATNFSLLKQAGDVEEN
PGPMPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKK
FDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPH
ATLVFDVELLKLGECSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLK
NLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCN
QHSPYWAPPCYTLKPETGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLPLALLHAAR
PILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR
DLMEAEQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGF
IILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSPPFPSSSFSPGG
LAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEAC
QVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFSPRDDLFLFSPSLLG
GPSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPTGVPDLVDFQPPPELV
REAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV
GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTSSLSASLGD

RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISN
 LEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGL
 VAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIK
 DNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSTVTVSSESKYGPPC
 PPCPMFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG
 CSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD
 PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKD
 TYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 122)

[0482] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende una secuencia de ácido nucleico que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 123.

[0483] ATGGAGATGTGGCACGAGGGACTGGAGGAGGCAAGCAGACTGTACTTTGGC
 GAGAGGAACGTGAAGGGCATGTTTCGAGGTGCTGGAGCCACTGCACGCAATGATGG
 AGAGGGGACCACAGACCCTGAAGGAGACATCTTTCAACCAGGCATACGGAAGGGAC
 CTGATGGAGGCACAGGAGTGGTGCCGGAAGTATATGAAGAGCGGCAATGTGAAGG
 ACCTGCTGCAGGCCTGGGATCTGTACTATCACGTGTTTCGGAGAATCTCCAAGGGC
 TCTGGCGCCACCAACTTCTCCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGATGTGGAGGAGAATCC
 TGGACCAATGCCACTGGGACTGCTGTGGCTGGGACTGGCCCTGCTGGGCGCCCTG
 CACGCCAGGCCGGCGTGAGGTGGAGACAATCAGCCCTGGCGACGGACGCACCT
 TTCAAAGAGGGGACAGACATGCGTGGTGCACTACACCGGCATGCTGGAGGATGG
 CAAGAAGTTCGACAGCTCCAGAGATAGGAATAAGCCCTTTAAGTTCATGCTGGGCAA
 GCAGGAAGTGATCAGGGGATGGGAGGAGGGAGTGGCACAGATGTCTGTGGGACAG
 CGGGCCAAGCTGACAATCAGCCCAGACTATGCATACGGAGCAACCGGACACCCTG
 GAATCATCCCACCTCACGCCACACTGGTGTGTTGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGGC
 GAGGGCAGCAACACCTCCAAGGAGAATCCATTTCTGTTCCGCTGGAGGCCGTGGT
 CATCTCTGTGGGCAGCATGGGCCTGATCATCTCCCTGCTGTGCGTGTACTTTTGGCT
 GGAGCGCACAATGCCACGGATCCCCACCCTGAAGAACCTGGAGGACCTGGTGACC
 GAGTACCACGGCAATTTCTCCGCCTGGTCTGGCGTGAGCAAGGGACTGGCAGAGTC
 TCTGCAGCCAGATTATAGCGAGCGGCTGTGCCTGGTGAGCGAGATCCCACCCAAGG
 GAGGCGCCCTGGGAGAGGGACCAGGAGCCTCCCCTTGCAACCAGCACTCTCCTTA
 CTGGGCCCCCTCCATGTTATACCCTGAAGCCAGAGACAGGCAGCGGAGCTACTAACT
 TCTCCCTGCTGAAGCAAGCAGGCGACGTGGAAGAAAATCCTGGACCAATGGCACTG
 CCAAGTACCGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCACGCAGCCAGACCCA
 TCCTGTGGCACGAAATGTGGCATGAAGGCCTGGAGGAGGCAAGCAGGCTGTACTTT
 GGCGAGCGGAATGTGAAAGGAATGTTTGAAGTGCTGGAGCCTCTGCACGCCATGAT
 GGAGAGGGGCCCTCAGACCCTGAAGGAGACATCCTTTAACCAGGCCTACGGCAGA

GACCTGATGGAGGCCAGGAGTGGTGCAGGAAGTATATGAAGTCTGGAAATGTGAA
AGACCTGCTGCAGGCCTGGGATCTGTATTATCACGTGTTTCAGGCGCATCTCTAAGG
GCAAGGATACAATCCCTTGGCTGGGACACCTGCTGGTGGGACTGAGCGGAGCCTTT
GGCTTCATCATCCTGGTGTATCTGCTGATCAACTGCCGCAATACAGGCCCATGGCTG
AAGAAGGTGCTGAAGTGTAACACCCCCGACCCTTCCAAGTTCTTTTCTCAGCTGTCT
AGCGAGCACGGCGGCGATGTGCAGAAGTGGCTGTCCTCTCCATTTCCCAGCTCCTC
TTTCAGCCCAGGAGGACTGGCACCAAGAGATCTCCCCACTGGAGGTGCTGGAGAGG
GACAAGGTGACCCAGCTGCTGCTGCAGCAGGATAAGGTGCCTGAGCCAGCCTCCC
TGAGCTCCAACCACTCCCTGACCTCTTGCTTTACAAATCAGGGCTACTTCTTTTTCCA
CCTGCCAGACGCACTGGAGATCGAGGCATGTCAGGTGTATTTACATACGATCCCT
ATAGCGAGGAGGACCCTGATGAGGGAGTGGCCGGCGCCCCAACCGGATCTAGCCC
ACAGCCTCTGCAGCCACTGAGCGGAGAGGACGATGCATATTGTACATTTCTTCCC
GCGACGATCTGCTGCTGTTCTCTCCAAGCCTGCTGGGAGGACCAAGCCCACCTTCC
ACCGCACCAAGCGGCTCCGGGGCAGGGGAGGAGCGGATGCCACCCTCTCTGCAG
GAGAGAGTGCCAAGGGACTGGGATCCACAGCCACTGGGACCTCCAACCCCTGGAG
TGCCAGACCTGGTGGATTTCCAGCCCCCTCCAGAGCTGGTGTGAGAGAGGCAGG
AGAGGAGGTGCCTGACGCAGGACCAAGAGAGGGCGTGAGCTTTCCTTGGTCCAGG
CCACCTGGACAGGGAGAGTTTCAGAGCCCTGAACGCCAGGCTGCCCTGAATACAG
ACGCCTACCTGTCTCTGCAGGAGCTGCAGGGCCAGGATCCTACACACCTGGTCGGA
TCTGGCGCCACCAACTTTAGCCTGCTGAAGCAGGCAGGCGACGTGGAAGAGAACC
CTGGACCAATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCACACCCT
GCCTTCCTGCTGATCCCAGATATCCAGATGACACAGACCACATCCTCTCTGTCCGCC
TCTCTGGGCGACAGAGTGACCATCTCTTGTAGGGCCAGCCAGGATATCTCCAAGTA
CCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCTGACGGCACAGTGAAGCTGCTGATCTACCACA
CCTCTAGGCTGCACAGCGGAGTGCCATCCCGGTTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACA
GACTATTCTCTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGATATCGCCACATACTTTTGC
CAGCAGGGCAATACCCTGCCATATACATTCGGCGGAGGAACCAAGCTGGAGATCAC
CGGAAGCACATCCGGATCTGGCAAGCCAGGATCCGGAGAGGGATCTACAAAGGGA
GAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGACCAGGACTGGTGGCACCCAGCCAGTCCCTGT
CTGTGACCTGTACAGTGTCTGGCGTGAGCCTGCCCGATTACGGCGTGTCTCTGGATC
AGACAGCCACCAAGGAAGGGACTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCTCTGAGA
CCACATACTATAATAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCA
AGTCCCAGGTGTTTCTGAAGATGAATAGCCTGCAGACCGACGATACAGCCATCTACT
ATTGCGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCTCCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAG
GGCACCTCCGTGACAGTGAGCTCCGAGTCTAAGTATGGCCCTCCATGCCCCCCTTG
TCCTATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGAGGCGTGCTGGCCTGTTACTCCCTGC
TGGTGACCGTGGCCTTTATCATCTTCTGGGTGAAGCGCGGCCGGAAGAAGCTGCTG

TATATCTTTAAGCAGCCCTTCATGAGACCTGTGCAGACCACACAGGAGGAGGACGG
 CTGCAGCTGTAGGTTTCCAGAGGAGGAGGAGGGAGGATGCGAGCTGCGCGTGAAG
 TTCTCTCGGAGCGCCGATGCCCCTGCCTACCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTATAA
 CGAGCTGAATCTGGGCCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGGA
 AGAGACCCAGAGATGGGAGGCAAGCCTCGGAGAAAGAACCCACAGGAGGGCCTGT
 ACAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTATTCCGAGATCGGCATGAAG
 GGAGAGAGGCGCCGGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACC
 GCCACAAAGGACACCTATGATGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCACCCAGGTGA
 (SEQ ID NO: 123)

[0484] En algunas formas de realización, las partículas lentivirales de la presente divulgación comprenden una secuencia de polinucleótidos que codifica, en orden 5' a 3' en una transcripción policistrónica:

- (a) un promotor MND;
- (b) un dominio FRB citosólico o una parte del mismo;
- (c) un CAR;
- (d) un dominio TGF- β DN o una parte del mismo; y
- (e) una secuencia WPRE.

[0485] En algunas formas de realización, las partículas lentivirales de la presente divulgación comprenden una secuencia de polinucleótidos que codifica, en orden 5' a 3':

- (a) un dominio FRB citosólico o una parte del mismo;
- (b) un CAR; y
- (c) un dominio TGF- β DN o una parte del mismo.

[0486] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende una secuencia polipeptídica que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 124.

[0487] MEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG
 RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKGSGATNFSLLKQAGDVEEN
 PGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWY
 QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPY
 TFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLP
 DYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWVGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDD
 TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSTVTVSSESKYGPPCPPCPMFWLVVVGVLAC
 YSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKF
 SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
 ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGAT
 NFSLLKQAGDVEENPGPMGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNN
 GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVVRKNDENITLETVC

HDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLL
VIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCYRVNRQQKRRR (SEQ ID NO: 124)

[0488] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral comprende una secuencia de ácido nucleico que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 125.

[0489] ATGGAGATGTGGCACGAGGGACTGGAGGAGGCATCCAGACTGTACTTCGGC
GAGAGGAACGTGAAGGGCATGTTTGAGGTGCTGGAGCCACTGCACGCCATGATGG
AGAGAGGCCCCAGACCCTGAAGGAGACATCTTTCAACCAGGCCTATGGAAGGGAC
CTGATGGAGGCACAGGAGTGGTGCCGGAAGTACATGAAGAGCGGCAATGTGAAGG
ACCTGCTGCAGGCCTGGGATCTGTACTATCACGTGTTCCGGAGAATCAGCAAGGGC
TCCGGCGCCACCAACTTTAGCCTGCTGAAGCAGGCAGGCGACGTGGAGGAGAATC
CAGGACCTATGCTGCTGCTGGTGACATCCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCACACCCA
GCCTTCCTGCTGATCCCCGATATCCAGATGACCCAGACCACAAGCTCCCTGAGCGC
CTCCCTGGGCGACAGGGTGACAATCTCTTGTCGGGCCAGCCAGGATATCTCCAAGT
ATCTGAATTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTATCAC
ACATCTAGACTGCACAGCGGCGTGCTTCCAGGTTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCAC
CGACTACTCTCTGACAATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGATATCGCCACCTATTTCTG
CCAGCAGGGCAATACCCTGCCTTACACATTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCA
CCGGCTCTACAAGCGGATCCGGCAAGCCAGGATCCGGAGAGGGATCTACCAAGGG
AGAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGACCTGGACTGGTGGCACCATCTCAGAGCCTG
TCCGTGACCTGTACAGTGTCTGGCGTGAGCCTGCCAGATTATGGCGTGAGCTGGAT
CAGGCAGCCACCTAGGAAGGGACTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCTCCGAG
ACCACATACTATAACAGCGCCCTGAAGTCCCGCCTGACCATCATCAAGGACAACCTCT
AAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAATTCCCTGCAGACCGACGATACAGCCATCTA
CTATTGCGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCTCTTATGCCATGGATTACTGGGGCCA
GGGCACCAGCGTGACAGTGTCTAGCGAGTCCAAGTACGGCCCACCCTGCCCTCCAT
GTCCCATGTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGAGGCGTGCTGGCCTGTTATTCCCTG
CTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAAGCGCGGCCGGAAGAAGCTGCT
GTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGAGACCCGTGCAGACCACACAGGAGGAGGACG
GCTGCAGCTGTAGGTTCCAGAGGAGGAGGAGGGAGGATGCGAGCTGAGGGTGAA
GTTTTCCCGGTCTGCCGATGCCCTGCCTATCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACA
ACGAGCTGAATCTGGGCAGGCGCGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGAGAGG
AAGGGACCCTGAGATGGGAGGCAAGCCAAGGCGCAAGAACCCTCAGGAGGGCCTG
TATAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATCGGCATGAA
GGGAGAGCGGAGAAGGGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTATCAGGGCCTGAGCAC
CGCCACAAAGGACACCTACGATGCACTGCACATGCAGGCCCTGCCACCTAGAGGAT

CTGGAGCCACAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGCGATGTGGAGGAGAATCCT
GGACCAATGGGAAGAGGACTGCTGAGGGGACTGTGGCCACTGCACATCGTGCTGT
GGACCAGGATCGCCTCTACAATCCCACCCACGTGCAGAAGAGCGTGAACAATGAC
ATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAGTTTCCCAGCTGTGCAAGTTCTGT
GACGTGCGCTTTTCCACCTGTGATAACCAGAAGTCCTGCATGTCTAATTGTAGCATC
ACATCCATCTGCGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAGAACG
ACGAGAATATCACCTGGAGACAGTGTGCCACGATCCCAAGCTGCCTTATCACGAC
TTCATCCTGGAGGATGCCGCCTCTCCTAAGTGTATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCC
AGGCGAGACCTTCTTTATGTGCAGCTGTTCTCTGACGAGTGCAACGATAATATCAT
CTTCTCCGAGGAGTACAACACCTCTAATCCTGACCTGCTGCTGGTCATCTTTCAGGT
GACAGGCATCTCCCTGCTGCCTCCACTGGGCGTGGCCATCTCTGTGATCATCATCTT
TTATTGTTACAGAGTGAACAGGCAGCAGAAGCGCCGCGCTAG (SEQ ID NO: 125)

[0490] En algunas formas de realización, el dominio FRB comprende una secuencia polipeptídica que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 251.

[0491] MEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG
RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISK (SEQ ID NO: 251)

[0492] En algunas formas de realización, el dominio gamma del receptor de IL-2 comprende una secuencia polipeptídica que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 252.

[0493] ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG
RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISK (SEQ ID NO: 252)

[0494] En algunas formas de realización, el dominio beta del receptor de IL-2 comprende una secuencia polipeptídica que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 253.

[0495] GVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDNRNPKFKFMLGKQ
EVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKL (SEQ ID NO: 253)

[0496] En algunas formas de realización, el complejo del receptor de la superficie celular activado por rapamicina (RACR) y el dominio FRB comprende una secuencia polipeptídica que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 254.

[0497] MEMWHEGLEEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG
RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKASRRKRGSGEGRGSLTTCG
DVEENPGPMPLPVTALLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEEASRLYFGERNVKGMFEV
LEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHV
FRRISKGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTE
YHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWA
PPCYTLKPETGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETI
SPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSRDNRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGEKGDTIPWLGHLLVGLS
GAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSS
FSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDA
LEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFSPRDDLFLS
PSLLGGPSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPTGVPDLVDFQPP
PELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQD
PTHLV(SEQ ID NO: 254)

[0498] En algunas formas de realización, el complejo del receptor de la superficie celular activado por rapamicina (RACR) y el dominio FRB y el CAR anti-CD19 comprende una secuencia polipeptídica que comparte al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 255.

[0499] MEMWHEGLEEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG
RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKASRRKRGSGEGRGSLTTCG
DVEENPGPMPLPVTALLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEEASRLYFGERNVKGMFEV
LEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHV
FRRISKGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTE
YHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWA
PPCYTLKPETGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETI
SPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSRDNRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGEKGDTIPWLGHLLVGLS
GAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSS
FSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDA
LEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFSPRDDLFLS
PSLLGGPSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPTGVPDLVDFQPP
PELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQD
PTHLVGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTTSSLSA
SLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYS
LTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQES

GPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYNSALKS
RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSGAVH
TRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE
EDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST
ATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 255)

Composiciones farmacéuticas y kits

[0500] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula según la divulgación y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0501] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un kit que comprende la partícula e instrucciones para su uso en la transducción de células diana y/o el tratamiento de un sujeto. El kit puede incluir un portador farmacéuticamente aceptable y/o un dispositivo de inyección. El kit puede incluir además tubos adecuados para administrar las partículas.

Formulaciones

[0502] Las formulaciones y composiciones de la presente divulgación pueden comprender una combinación de cualquier número de partículas virales y, opcionalmente, uno o más agentes farmacéuticos adicionales (polipéptidos, polinucleótidos, compuestos, etc.) formulados en composiciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables para su administración a una célula, tejido, órgano o animal, ya sea solos o en combinación con una o más modalidades terapéuticas. En algunas formas de realización, el uno o más agentes farmacéuticos adicionales aumentan aún más la eficiencia de transducción de las partículas virales.

[0503] En algunas formas de realización, las formulaciones y composiciones de la presente divulgación pueden comprender una combinación de cualquier número de partículas virales.

[0504] La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un casete de expresión o vector (por ejemplo, vector terapéutico) divulgado en el presente documento y uno o más excipientes, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende un vector lentiviral que comprende un casete de expresión descrito en el presente documento, por ejemplo, en donde el casete de expresión comprende una o más secuencias de polinucleótidos que codifican uno o más receptores de antígenos quiméricos (CAR) y variantes de los mismos.

[0505] Las composiciones farmacéuticas que contienen el casete de expresión o el genoma del vector pueden presentarse en cualquier forma adecuada para el modo de administración seleccionado, por ejemplo, para administración intraventricular, intramiocárdica, intracoronaria, intravenosa, intraarterial, intrarrenal, intrauretral, epidural, intratecal, intraperitoneal o intramuscular. El genoma vector puede administrarse, como único agente activo o en combinación con otros agentes activos, en una forma de administración unitaria, como mezcla con excipientes farmacéuticos, a animales y seres humanos. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende células transducidas ex vivo con cualquiera de los genomas vector según la presente divulgación.

[0506] Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación, la formulación de excipientes farmacéuticamente aceptables y las soluciones portadoras pueden ser útiles para los expertos en la técnica, por ejemplo, para el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para utilizar las composiciones particulares descritas en el presente documento en una variedad de regímenes de tratamiento, incluyendo, por ejemplo, la administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal, intraperitoneal e intramuscular.

[0507] En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona formulaciones o composiciones adecuadas para la administración de sistemas de vectores virales (es decir, transducción mediada por virus), incluyendo, pero sin limitación, vectores retrovirales (por ejemplo, lentivirales).

Método de uso In vitro o ex vivo

[0508] Las composiciones descritas en el presente documento, tales como las proteínas de fusión o las partículas descritas, pueden utilizarse in vitro o ex vivo. Las partículas lentivirales descritas pueden utilizarse ex vivo, en un proceso de fabricación de células o en el lecho del paciente, tal como se describe, por ejemplo, en la publicación internacional de patente N.º WO 2022/072885, la publicación internacional de patente N.º 2019/217954, la publicación internacional de patente N.º 2020/123649 y la publicación internacional de patente N.º 2009/072003. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un método ex vivo para transducir células diana, que comprende poner en contacto las células diana con la partícula según la presente divulgación. En algunas formas de realización, las partículas descritas en el presente documento pueden utilizarse para transducir células que no han sido activadas previamente. Por ejemplo, las partículas descritas en el presente documento pueden ser útiles para transducir células que no han sido previamente puestas en contacto con perlas de activación celular o reactivos de activación (por ejemplo, Dynabeads u otros reactivos que comprenden

anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 o fragmentos de unión de los mismos). Cuando un método aquí descrito describe el uso de una partícula lentiviral, se contempla el uso de otra partícula cuando sea apropiado y factible. Cuando un método aquí descrito describe el uso de una partícula lentiviral, también se contempla el uso de una composición o molécula de fusión cuando sea apropiado y factible. Por ejemplo, una molécula de fusión, contenida en la superficie de una partícula lentiviral, o una composición farmacéutica pueden administrarse o ponerse en contacto con una célula, como una célula inmunitaria (por ejemplo, una célula T).

[0509] Entre los ejemplos no limitativos de células que pueden ser el objetivo de la partícula lentiviral descrita en el presente documento se incluyen los linfocitos T, las células dendríticas (DC), las células Treg, las células B, las células asesinas naturales y los macrófagos.

Fabricación ex vivo

[0510] En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para administrar un ácido nucleico a una célula ex vivo. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un método para administrar un ácido nucleico a una célula inmunitaria ex vivo. En algunas formas de realización, las partículas lentivirales de la divulgación activan y transducen una célula inmunitaria ex vivo. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un método para administrar un ácido nucleico a una célula en un proceso de fabricación ex vivo en circuito cerrado. En algunas formas de realización, un proceso de fabricación ex vivo es un proceso extracorpóreo. En formas de realización ejemplares, los vectores lentivirales descritos en la presente memoria permiten la administración de un ácido nucleico a una célula diana durante un proceso de circuito cerrado. En la publicación de patente US N.º 2021/0244871 y en la publicación internacional WO2022072885, ambas incorporadas aquí en su totalidad, se describen métodos ejemplares de procesos de circuito cerrado y/o extracorpóreos. En algunas formas de realización, los vectores lentivirales descritos en la presente pueden utilizarse para transducir células ex vivo. Por ejemplo, en procesos de fabricación en bucle cerrado ejemplares, se obtienen células de un sujeto, se lavan, se incuban y/o se ponen en contacto con partículas lentivirales, se lavan de nuevo opcionalmente y se infunden en el sujeto en un sistema de bucle cerrado. En tales formas de realización, las partículas lentivirales descritas en el presente documento son útiles incluso sin activación previa de las células y son capaces de unirse a las células en una etapa de incubación y/o contacto corta. En algunas formas de realización, la etapa de incubación y/o contacto es de aproximadamente una hora o menos. En algunas formas de realización, la etapa de incubación y/o contacto es de aproximadamente una hora o menos, aproximadamente dos horas o menos, aproximadamente tres horas o menos, aproximadamente cuatro

horas o menos, o aproximadamente cinco horas o menos. En algunas formas de realización, la etapa de incubación y/o contacto es de menos de 12 horas o menos de 24 horas. En algunas formas de realización, se administra un ácido nucleico a una célula mediante transducción con un vector lentiviral, de modo que el ácido nucleico entra en la célula ex vivo. En algunas formas de realización, se administra un ácido nucleico a una célula poniendo en contacto el vector lentiviral con la superficie de la célula. En tales formas de realización, el ácido nucleico puede entrar en la célula ex vivo o in vivo después de que las células (complejadas con el vector lentiviral) se infundan de nuevo en el sujeto.

[0511] En algunas formas de realización, se proporcionan sistemas y métodos de cabecera para realizar terapias y tratamientos basados en células de una manera conectada al sujeto, en bucle cerrado y de flujo continuo, incluyendo modificaciones y tratamientos celulares, por ejemplo, para producir células T con receptores de antígenos quiméricos (CAR T). En algunas formas de realización de un sistema descrito aquí, se extrae sangre de un sujeto, se procesa, se personaliza y se devuelve al sujeto en un bucle cerrado y de flujo continuo. Se utiliza una disposición de módulos y unidades de forma secuencial para la separación y recogida de células diana de la sangre total, empleando, por ejemplo, leucoaféresis y/u otras técnicas de enriquecimiento celular, incluyendo opcionalmente el enriquecimiento, la purificación y/o el lavado de células mediante un dispositivo de elutriación, seguido de uno o más procedimientos de personalización celular, por ejemplo, para generar células CAR-T, opcionalmente seguidos de enriquecimiento celular, purificación, fraccionamiento y/o lavado, tras lo cual la fracción procesada y modificada que comprende las células CAR-T se devuelve al sujeto por medio de un conducto de salida. Un sistema ejemplar es fabricado por Lupagen™ y es un sistema de flujo continuo en circuito cerrado. Dichos sistemas y métodos se describen en el documento WO2019217964, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

[0512] En algunas formas de realización, los vectores lentivirales descritos en el presente documento eliminan la necesidad de una etapa de activación ex vivo. En tales formas de realización, las células aisladas podrían transducirse directamente después de la leucoaféresis, el lavado o la selección. Se contempla que la ingeniería de superficie descrita en el presente documento permite que las partículas lentivirales descritas en el presente documento activen y transducen células en una sola etapa. En tales formas de realización, las partículas lentivirales descritas en el presente documento pueden permitir un proceso de fabricación corto o truncado, reduciendo el tiempo dedicado a la fabricación ex vivo al eliminar una o más operaciones unitarias (por ejemplo, la activación previa a la transducción) y/o reduciendo la cantidad de tiempo que puede ser necesario

en el cultivo celular postransducción. Sin querer estar limitado por la teoría, en algunas formas de realización, los vectores lentivirales descritos en el presente documento, en particular aquellas partículas que comprenden una proteína de fusión multidominio, se unen a las células diana con una mayor avidéz que las partículas lentivirales que no comprenden una proteína de fusión multidominio. En tales formas de realización, la proteína de fusión multidominio puede permitir que las partículas lentivirales descritas se unan a las células diana con mayor fuerza, reduciendo el tiempo de incubación para la transducción y aumentando la frecuencia y la eficiencia de la transducción. En algunas formas de realización, el tiempo para unir eficazmente una partícula lentiviral a una célula diana puede ser de una hora o menos.

[0513] Se contempla que la presente divulgación proporciona un método ex vivo para generar una célula modificada que comprende poner en contacto una célula diana con una partícula que comprende una molécula de fusión que comprende una molécula de adhesión unida a una molécula coestimuladora, una molécula de fusión que comprende una molécula de adhesión unida a una molécula de activación, o una molécula de fusión que comprende una molécula de adhesión unida a una molécula coestimuladora y una molécula de activación, en donde la etapa de contacto se lleva a cabo durante aproximadamente una hora, aproximadamente dos horas, aproximadamente tres horas, aproximadamente cuatro horas, aproximadamente cinco horas, aproximadamente seis horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 12-24 horas (incluidos los puntos finales), o más. Este método puede requerir que el paso de contacto se realice en un proceso de fabricación en circuito cerrado o extracorpóreo, tal como se describe en el presente documento. Alternativamente, este método puede requerir que el paso de contacto se realice en un proceso tradicional de fabricación de células modificadas ex vivo. Por ejemplo, en una incubadora de perfusión o una centrífuga (como una máquina Sepax o Rotea).

Método de uso in vivo

[0514] En algunas formas de realización, las partículas lentivirales descritas en el presente documento transducen células diana in vivo. En algunas formas de realización, las células diana son células inmunitarias. En algunas formas de realización, las células inmunitarias son células T. En algunas formas de realización, las partículas lentivirales descritas en el presente documento transducen células T in vivo. En algunas formas de realización, las partículas lentivirales descritas en el presente documento transducen células T in vivo generando células CAR T. En algunas formas de realización, las partículas lentivirales descritas en el presente documento muestran un polipéptido de trifusión CD58-CD80-anti-CD3 scFv y transducen células T in vivo generando células

CAR T. Cuando un método descrito en el presente documento describe el uso de una partícula lentiviral, se contempla el uso de otra partícula cuando sea factible.

[0515] En algunas formas de realización, la partícula viral se administra por una vía seleccionada del grupo que consiste en extracorpórea, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratumoral, intraperitoneal e intralinfática. En algunas formas de realización, la partícula viral se administra varias veces. En algunas formas de realización, la partícula viral se administra mediante inyección intralinfática de la partícula viral. En algunas formas de realización, la partícula viral se administra mediante inyección intraperitoneal de la partícula viral. En algunas formas de realización, la partícula viral se administra mediante inyección intraganglionar, es decir, la partícula viral puede administrarse mediante inyección en uno o más ganglios linfáticos. En algunas formas de realización, los ganglios linfáticos para la administración son los ganglios linfáticos inguinales. En algunas formas de realización, la partícula viral se administra mediante inyección de la partícula viral en los sitios tumorales (es decir, intratumoral). En algunas formas de realización, la partícula viral se administra por vía subcutánea. En algunas formas de realización, la partícula viral se administra de forma sistémica. En algunas formas de realización, la partícula viral se administra por vía intravenosa. En algunas formas de realización, la partícula viral se administra por vía intraarterial. En algunas formas de realización, la partícula viral es una partícula lentiviral.

[0516] En algunas formas de realización, la partícula lentiviral se administra por inyección intraperitoneal, subcutánea o intranodal. En algunas formas de realización, la partícula lentiviral se administra por inyección intraperitoneal. En algunas formas de realización, la partícula lentiviral se administra por inyección subcutánea. En algunas formas de realización, la partícula lentiviral se administra por inyección intranodal.

[0517] La presente divulgación proporciona un método de tratamiento que comprende la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de partículas lentivirales a un sujeto que la necesita. En algunas formas de realización, se administra una dosis terapéuticamente eficaz de las partículas lentivirales descritas en el presente documento. En algunas formas de realización, una dosis terapéuticamente eficaz comprende aproximadamente $0,1 \times 10^6$ unidades transductoras. (TU), aproximadamente $0,2 \times 10^6$ TU, aproximadamente $0,3 \times 10^6$ TU, aproximadamente $0,4 \times 10^6$ TU, aproximadamente $0,5 \times 10^6$ TU, aproximadamente $0,6 \times 10^6$ TU, aproximadamente $0,7 \times 10^6$ TU, aproximadamente $0,8 \times 10^6$ TU, aproximadamente $0,9 \times 10^6$ TU, aproximadamente 1×10^6 TU, aproximadamente $1,2 \times 10^6$ TU, aproximadamente $1,4 \times 10^6$ TU, aproximadamente $1,6 \times 10^6$ TU, aproximadamente $1,8 \times 10^6$ TU, aproximadamente $0,1 \times 10^6$ TU, aproximadamente $0,1 \times 10^6$ TU, aproximadamente $0,1 \times 10^6$ TU, aproximadamente 2×10^6 TU, aproximadamente $2,5 \times 10^6$ TU, aproximadamente 3×10^6

TU, aproximadamente 4×10^6 TU, aproximadamente 5×10^6 TU, aproximadamente 6×10^6 TU, aproximadamente 7×10^6 TU, aproximadamente 8×10^6 TU, aproximadamente 9×10^6 TU, aproximadamente 1×10^7 TU, aproximadamente 2×10^7 TU, aproximadamente 3×10^7 TU, aproximadamente 4×10^7 TU, aproximadamente 5×10^7 TU, aproximadamente 6×10^7 TU, aproximadamente 7×10^7 TU, aproximadamente 8×10^7 TU, aproximadamente 9×10^7 TU, aproximadamente 1×10^8 TU, aproximadamente 2×10^8 TU, aproximadamente 3×10^8 TU, aproximadamente 4×10^8 TU, aproximadamente 5×10^8 TU, aproximadamente 6×10^8 TU, aproximadamente 7×10^8 TU, aproximadamente 8×10^8 TU, aproximadamente 9×10^8 TU, aproximadamente 1×10^9 TU o aproximadamente 2×10^9 TU.

[0518] En algunas formas de realización, las células inmunitarias transducidas que comprenden el polinucleótido de la presente divulgación se administran al sujeto.

[0519] La divulgación proporciona un método para tratar una neoplasia maligna en un sujeto, que comprende administrar al sujeto las partículas lentivirales o la composición farmacéutica de la divulgación. En algunas formas de realización, la neoplasia maligna es una neoplasia de células B, un mieloma o una neoplasia maligna de tumor sólido. La divulgación proporciona un método para tratar el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), el linfoma de células B grandes de tipo Burkitt (B-LBL), el linfoma folicular (FL), la leucemia linfocítica crónica (CLL), la leucemia linfocítica aguda (ALL), el linfoma de células del manto (MCL), la neoplasia maligna hematológica, el cáncer de colon, el cáncer de pulmón, el cáncer de hígado, el cáncer de mama, el cáncer de riñón, el cáncer de próstata, el cáncer de ovario, cáncer de piel, melanoma, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, carcinoma de células escamosas, leucemia, mieloma, linfoma de células B, cáncer de riñón, cáncer de útero, adenocarcinoma, cáncer de páncreas, leucemia mielógena crónica, glioblastoma, neuroblastoma, meduloblastoma o sarcoma en un sujeto, que comprende administrar al sujeto las partículas lentivirales o la composición farmacéutica de la divulgación.

Método de fabricación

[0520] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un método para fabricar una partícula, que comprende introducir un polinucleótido que codifica un genoma vector en una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica una molécula de fusión (o proteína de fusión) como se describe en el presente documento. La molécula de fusión (o proteína de fusión) y el genoma vector se expresan mediante la célula huésped. La célula huésped empaqueta el genoma vector en una partícula lentiviral que comprende la molécula de fusión (o proteína de fusión).

[0521] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un método in vivo para transducir células diana en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al

sujeto una partícula o una composición farmacéutica de la divulgación. La partícula puede administrarse por inyección intranodal, intravenosa o subcutánea.

[0522] Se pueden tratar diversas enfermedades o trastornos utilizando partículas como las descritas en el presente documento, o una composición farmacéutica que las comprenda. Las partículas pueden administrarse a un sujeto que padezca o tenga riesgo de padecer una neoplasia maligna de células B, una neoplasia maligna recidivante/refractaria, un linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), un linfoma de células B grandes de tipo Burkitt (B-LBL), un linfoma folicular (FL), una leucemia linfocítica crónica (CLL), una leucemia linfocítica aguda (ALL), un linfoma de células del manto (MCL), malignidad hematológica, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de piel, melanoma, cáncer de hueso, cáncer de cerebro, carcinoma de células escamosas, leucemia, mieloma, linfoma de células B, cáncer de riñón, cáncer de útero, adenocarcinoma, cáncer de páncreas, leucemia mielógena crónica, glioblastoma, neuroblastoma, meduloblastoma o sarcoma.

[0523] Las partículas lentivirales de la presente divulgación pueden mejorar la actividad in vivo. Las partículas lentivirales de la presente divulgación resisten la inactivación sérica. Las partículas lentivirales de la presente divulgación proporcionan una orientación eficaz de las células T activadas. Las partículas lentivirales de la presente divulgación pueden requerir una baja cantidad de partículas físicas por unidad de transducción en comparación con las glicoproteínas de dos componentes. Las partículas lentivirales de la presente divulgación conservan el potencial de transducir una amplia gama de células efectoras no T. Las partículas lentivirales de la presente divulgación mejoran la unión de las partículas a las células T. Las partículas lentivirales de la presente divulgación mejoran la activación de las células T. Las partículas lentivirales de la presente divulgación mejoran la expansión de las células inmunitarias. Las partículas lentivirales de la presente divulgación mejoran la transducción de las células inmunitarias. Las partículas lentivirales de la presente divulgación mejoran la potencia antitumoral. Las partículas lentivirales de la presente divulgación mejoran la persistencia de las células inmunitarias.

[0524] Algunas formas de realización incluyen un método para fabricar una molécula de adhesión, una molécula coestimuladora, una molécula de activación o una molécula de fusión. El método puede incluir la transcripción o traducción de un ácido nucleico (como un ADN o un ARN) que codifica una proteína que comprende la molécula de adhesión, la molécula coestimuladora, la molécula de activación o la molécula de fusión.

Kits

[0525] En la presente se describen, en algunas formas de realización, kits. En algunas formas de realización, el kit incluye una molécula de adhesión. En algunas formas de realización, el kit incluye una molécula coestimuladora. En algunas formas de realización, el kit incluye una molécula de activación. En algunas formas de realización, el kit incluye una molécula de fusión. En algunas formas de realización, el kit incluye una partícula. En algunas formas de realización, el kit incluye una composición descrita en el presente documento. El kit puede incluir instrucciones de uso, tales como instrucciones para su uso en un método aquí descrito.

EJEMPLOS

[0526] Los siguientes ejemplos describen cómo se pueden realizar, evaluar y utilizar las formas de realización de la invención. Los ejemplos tienen carácter ilustrativo y no limitativo.

Ejemplo 1

[0527] Este ejemplo muestra algunos efectos de incorporar una molécula coestimuladora, como CD80, y/o una proteína de adhesión, como CD58, en la superficie de una partícula lentiviral. En la Figura 1 se muestra un esquema de algunas de estas partículas lentivirales.

Producción de virus

[0528] Se sembraron $1,2 \times 10^6$ células 293T en placas de 6 pocillos tratadas con TC en un volumen total de 2,5 ml de medio DMEM completo por pocillo. 24 horas después, las células se transfectaron a temperatura ambiente.

[0529] Se añadió el siguiente ADN a 500 μ l de medio OptiMEM™ sin suero: 2 μ g de plásmido de transferencia, 1 μ g de plásmido Gag/pol, 1 μ g de plásmido REV y 1 μ g de plásmido de envoltura. A continuación, se añadieron 15 μ l (15 μ g) de PEI a la mezcla de medio/ADN. La solución se mezcló bien y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, la mezcla de medio/ADN/PEI se añadió a 2,5 ml de medio DMEM completo fresco. Se retiró el medio de siembra del pocillo que contenía 293T y se sustituyó por medio fresco que contenía los reactivos de transfección, y se colocó en una incubadora humidificada a 37 °C. 48 horas después, se recogió el sobrenadante y se filtró a través de un filtro de PVDF de 0,45 μ m. El sobrenadante que contenía el virus se concentró utilizando una columna Amicon-Ultra 15 100K y se centrifugó a 3000 x g durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, el virus se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Títulos de transducción 293T

[0530] Se sembraron 1×10^5 células 293T en placas de 12 pocillos tratadas con TC en 1 ml de medio DMEM completo. 24 horas después, se contaron los pocillos vacíos 3 veces

para calcular el título. A continuación, se añadió el virus a los pocillos en cantidades de: 2 μ l, 1 μ l, 0,5 μ l, 0,2 μ l, 0,1 μ l o 0,05 μ l de virus por pocillo. El virus se diluyó 1:100 antes de añadirlo a las células 293T. Tres días después, se recogieron las células 293T para su análisis por citometría de flujo. Se retiró el medio y se lavaron las células en PBS. A continuación, se lavaron las células en tripsina y se incubaron durante unos 3-5 minutos en una incubadora a 37 °C. Las células se resuspendieron en 1 ml de tampón FACS y se añadieron ~100-200 μ l a una placa de 96 pocillos con fondo en V. Se realizó un análisis por citometría de flujo para determinar la expresión de mCherry.

Cálculo del título 293T

[0531] $TU/ml = (\text{número de células en el momento de la transducción} \times \%mCherry+ \times 100)/(\text{volumen del vector en } \mu\text{l} \times 1000)$

[0532] Se añadieron partículas modificadas genéticamente que contenían un CAR anti-CD19 con CD3scFV solo o CD3scFV+CD80, CD3scFV+CD58 o CD3scFV+CD80+CD58 a las PBMC de 2-3 donantes.

Ejemplo 2

[0533] Este ejemplo muestra que la incorporación de una molécula coestimuladora y/o una molécula de adhesión en una partícula lentiviral mejoró la transducción de PBMC por partículas lentivirales tal como se generaron en el Ejemplo 1.

Producción de virus

[0534] Todas las soluciones utilizadas fueron las mismas que las descritas en el Ejemplo 1. Se sembraron 28×10^6 células 293T en 16 frascos T175 (8 por vector) con 28×10^6 células 293T cada uno en un volumen total de 25 ml de medio DMEM completo. 24 horas después, se transfectaron las células. El virus se produjo tal como se describe en el Ejemplo 1. Todos los virus incluían una proteína de envoltura Cocal.

[0535] Lista de preparaciones de virus realizadas para el estudio:

1. Solo CD3scfv
2. CD3scfv+CD58
3. CD3scfv+CD80

Transducción de PBMC y tinción para citometría de flujo

[0536] Se descongelaron 50×10^6 PBMC y se diluyeron a 2×10^6 células/ml en medio completo (por ejemplo, RPMI u Optimem). Se añadió IL-2 hasta una concentración final de 50 UI/ml.

[0537] Se añadieron 500 μ l (1×10^6 células) a los pocillos de una placa de 48 pocillos no tratada con TC. Se añadió el vector a los pocillos con un MOI = 10, 5 y 2 según el título de SupT1 ddPCR y se colocaron las placas en una incubadora a 37 °C.

[0538] Después de 3 días, se lavó el vector y se sustituyó por 500 μ l de medio RPMI fresco + IL-2 (50 UI/ml). Se mezclaron las células y se añadieron 100-300 μ l a los

pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo en V para el análisis por citometría de flujo de activación. A continuación, las células se lavaron con 200 µl de tampón FACS. Los pellets celulares se resuspendieron en 50-100 µl de PBS con LiveDead Stain (1:1000) y se incubaron a 4 °C durante 20 minutos, seguido de otro lavado con 200 µl de tampón FACS. Las células se resuspendieron en 50 µl de tampón FACS + cóctel de tinción de superficie, se incubaron durante 30 minutos a 4 °C y se lavaron en 200 µl de tampón FACS.

Resultados y conclusiones

[0539] Para evaluar si las partículas lentivirales con moléculas coestimuladoras podían activar mejor las células T humanas, se añadieron las partículas vectoriales a PBMC humanas a varios MOI. Tres días después, se eliminó el virus y se añadió medio fresco a las células, que se analizaron para detectar el marcador de activación CD25. Las partículas CD3scfv+CD58 y CD3scfv+CD80 activaron potentemente las células T CD8 en comparación con solo CD3scfv (FIG. 2A y FIG. 2B). Además, la regulación al alza de CD25 fue dependiente de la dosis (FIG. 2A y FIG. 2B). Las partículas lentivirales solo CD3scfv indujeron niveles mínimos de CD25 en comparación con las partículas con CD80 o CD58 (FIG. 2A y FIG. 2B).

[0540] Para examinar la transducción, 6 días después de la adición del vector, se analizaron muestras para detectar la expresión de CAR anti-CD19. Reflejando la expresión de CD25 en el día 3, las partículas CD3scfv+CD58 y CD3scfv+CD80 fueron capaces de transducir PBMC no estimuladas, mientras que las partículas CD3scfv solo transducían PBMC no estimuladas en menor medida (FIG. 2C-2F). Además, la transducción se produjo de forma dependiente de la dosis tanto para las células T CD3 como para las CD8 (FIG. 2C-2F). Los datos muestran que las partículas CD3scfv+CD58 y CD3scfv+CD80 activan y transducen eficazmente las PBMC no estimuladas in vitro en comparación con solo CD3scfv. Es importante destacar que las partículas mejoradas dan lugar a un aumento del número de células T CAR+ (FIG. 2D-2F).

[0541] Para determinar si la adición de moléculas coestimuladoras a las partículas mejora la expansión mediada por Rapa de las células CAR+ in vitro, se determinó la expansión múltiple de las células T CD8 utilizando partículas CD3scfv+CD80 en comparación con partículas solo CD3scfv. Las PMBC se cultivaron en medios que solo contenían IL-2 o solo rapamicina. La adición de la molécula coestimuladora no afectó a la expansión cuando se cultivó solo con IL-2 (FIG. 2G), pero la molécula coestimuladora indujo una expansión drástica cuando se cultivó con rapamicina (FIG. 2H). Estos resultados demuestran que la adición de moléculas coestimuladoras a las partículas mejoró la expansión mediada por rapamicina de las células CAR+ in vitro.

[0542] Este estudio demostró la capacidad de la estructura de envoltura de CD3scfv + moléculas coestimuladoras para administrar cargas útiles compuestas por un CAR anti-CD19 a PBMC no estimuladas in vitro. Las partículas CD3scfv+CD58 y CD3scfv+CD80 indujeron la activación de las células T, medida por la expresión de CD25, y esta activación se correlacionó con la transducción, medida por el porcentaje de células T que expresaban el CAR anti-CD19 y el total de células T CAR+. Además, la activación y la transducción se produjeron de forma dependiente de la dosis. Las moléculas coestimuladoras también potencian la expansión mediada por rapamicina de las células CAR+ in vitro. Estos datos respaldan aún más el uso de partículas CD3scfv+CD58 y CD3scfv+CD80 para administrar cargas útiles CAR a PBMC no estimuladas in vitro e in vivo.

Ejemplo 3

[0543] Este ejemplo muestra que la combinación de una molécula coestimuladora (CD80 en este caso) y una proteína de adhesión (CD58 en este caso) potenció aún más la activación y la transducción de las células T. Se generaron partículas que contenían ambas moléculas. Se examinó la capacidad de estas partículas para activar y transducir PBMC humanas no estimuladas en comparación con partículas que solo contenían anti-CD3scFv.

Producción de virus

[0544] Todas las soluciones utilizadas fueron las mismas que las descritas en el Ejemplo 1. Se sembraron 28×10^6 células 293T en 16 frascos T175 (8 por vector) con 28×10^6 células 293T cada uno en un volumen total de 25 ml de medio DMEM completo. 24 horas después, se transfectaron las células. El virus se produjo tal como se describe en el Ejemplo 1.

[0545] Lista de preparaciones de virus realizadas para el estudio:

1. Solo CD3scfv
2. CD3scfv+CD58
3. CD3scfv+CD8
4. CD3scfv+CD80+CD58

Transducción y análisis de PBMC

[0546] Las PBMC se transducían y se analizaban para determinar su expresión tal como se describe en el Ejemplo 2.

[0547] El análisis de las citoquinas en el sobrenadante se realizaba mediante Meso Scale Discovery (MSD) tres días después de la transducción.

[0548] Las células tumorales K562.CD19, Raji y Nalm6 totales se seguían a lo largo del tiempo en un IncuCyte® durante un máximo de 15 días.

Resultados y conclusiones

[0549] Para evaluar si las partículas lentivirales con moléculas coestimuladoras y moléculas de adhesión mejoran la activación y la transducción de las células T, se añadieron partículas lentivirales a PBMC humanas a varios MOI. Tres días después, se eliminó el virus, se proporcionó un medio fresco a las células y se analizaron para detectar el marcador de activación CD25. Las partículas CD3scfv+CD80+CD58 activaron potentemente las células T CD8 en comparación con CD3scfv+CD58, CD3scfv+CD80 y CD3scfv solo (FIG. 3A y FIG. 3B). Además, la regulación al alza de CD25 fue dependiente de la dosis y las partículas CD3scfv+CD80+CD58 activaron las células T CD8 a una dosis mucho menor (FIG. 3A y FIG. 3B). Las partículas lentivirales CD3scfv+CD58, CD3scfv+CD80 y CD3scfv solo indujeron niveles mínimos de CD25 en comparación con las partículas CD3scfv+CD80+CD58 (FIG. 3A y FIG. 3B).

[0550] Para caracterizar mejor la activación de las células T, tres días después de la adición del vector, se analizaron muestras para determinar la expresión de citoquinas. De forma similar a la expresión de CD25, las partículas CD3scfv+CD80 y CD3scfv+CD80+CD58 fueron capaces de inducir la producción de IFN- γ en PBMC no estimuladas a dosis más bajas, mientras que las partículas CD3scfv+CD58 y CD3scfv solo transducían las PBMC no estimuladas en menor medida (FIG. 3C). Además, las partículas CD3scfv+CD80+CD58 indujeron IL-2 y TNF- α de forma robusta, mientras que CD3scfv+CD58, CD3scfv+CD80 y CD3scfv por sí solas no lo hicieron (FIG. 3D y FIG. 3E). Los datos muestran que las partículas CD3scfv+CD80+CD58 inducen eficazmente la producción de citoquinas en PBMC no estimuladas in vitro en comparación con CD3scfv+CD58, CD3scfv+CD80 y CD3scfv solo.

[0551] Para examinar el papel de CD80 y CD58 en la transducción, tres días después de la adición del vector, se analizaron muestras para detectar la expresión de CAR anti-CD19 con partículas mixtas de CD3scfv+CD80 y CD3scfv+CD58 (FIG. 3F y FIG. 3G) o CD3scfv+CD80+CD58 en la misma partícula (FIG. 3H y FIG. 3I) en comparación con CD3scfv+CD58, CD3scfv+CD80 y CD3scfv solo. Las partículas mixtas CD3scfv+CD80 y CD3scfv+CD58 o CD3scfv+CD80+CD58 en la misma partícula fueron capaces de transducir PBMC no estimuladas en mayor medida que CD3scfv+CD58, CD3scfv+CD80 y CD3scfv solo (FIG. 3F, FIG. 3G, FIG. 3H y FIG. 3I). Además, la transducción se produjo de forma dependiente de la dosis tanto para las células T CD3 como para las CD8 (FIG. 3F, FIG. 3G, FIG. 3H y FIG. 3I). Los datos muestran que tanto el CD58 como el CD80, ya sea en partículas mixtas o en la misma partícula, activan y transducen mejor las PBMC no estimuladas in vitro en comparación con CD3scfv+CD58, CD3scfv+CD80 y CD3scfv solo.

[0552] Para determinar si las partículas lentivirales con moléculas coestimuladoras y/o de adhesión han mejorado la unión de las partículas a las células T, las partículas se cultivaron con PBMC durante 6 horas y, a continuación, se analizaron las moléculas asociadas a las partículas en las células T (Cocal, CD80 y CD58). Tanto CD3scfv+CD58 como CD3scfv+CD80+CD58 aumentaron la tinción de Cocal (FIG. 3J) y solo CD3scfv+CD80+CD58 mostró una alta tinción para CD80 (FIG. 3K) y CD58 (FIG. 3L). Los datos muestran que la combinación de CD3scfv+CD80+CD58 mejora la unión de las partículas a las células T.

[0553] Para determinar si las partículas lentivirales generan diferentes subtipos de células T, se perfilaron las PBMC cultivadas con las partículas lentivirales y se seleccionaron las viables, CD3+ y CD8+. Las células se analizaron posteriormente mediante flujo y se realizó un análisis de componentes principales basado en los parámetros enumerados CCR7, CD45R, CD45RA, CD27, CD25, CAR+, células totales, CD4 y CD8. El análisis reveló que las diferentes partículas producen tres grupos principales de diferenciación (FIG. 3M).

[0554] A continuación, se perfiló los subtipos de células T generados por las partículas. Las células se evaluaron utilizando marcadores CD45RA y CCR7 siete días después de la transducción con un MOI de 10. Las células T vírgenes son CD45RA+CCR7+, las células T efectoras (T_{eff}) son CD45RA-CCR7-, las células T de memoria central (T_{cm}) son CD45RA-CCR7+ y las células T de memoria efectoras terminalmente diferenciadas (Temra) son CD45RA+CCR7-. En un primer experimento, las partículas CD3scfv solo produjeron una mayoría de células T_{eff} , mientras que las partículas CD3scfv+CD80 produjeron una mayoría de células T_{cm} (FIG. 3N). En un segundo experimento, las partículas CD3scfv solo produjeron células T_{eff} y T_{cm} , las partículas CD3scfv+CD80 produjeron una mayoría de células T_{cm} , las partículas CD3scfv+CD58 produjeron una mayoría de células T_{cm} y las partículas CD3scfv+CD80+CD58 produjeron una mayoría de células T_{cm} (FIG. 3O). Los datos muestran que la adición de CD80 y/o CD58 a la partícula produce de forma consistente un fenotipo de células T_{cm} . Se cree que las células T_{cm} CD45RA-CCR7+ tienen una mayor longevidad y capacidad proliferativa y se correlacionan con mejores respuestas antitumorales in vivo.

[0555] Para evaluar la eficacia antitumoral de las células CAR-T generadas utilizando partículas lentivirales que expresan moléculas coestimuladoras y/o de adhesión, se transducían y cultivaban PBMC con células tumorales. Concretamente, se añadieron partículas que contenían una secuencia de nucleótidos que codificaba un CAR anti-CD19 a las PBMC con un MOI de 10, junto con células tumorales (células K562.CD19 o Raji) en una proporción de PBMC:tumor de 5:1, y se colocaron directamente en un Incucyte. Se midió la destrucción de las células tumorales a lo largo del tiempo. La mayor

destrucción se observó con partículas compuestas por al menos CD80 además de CD3scfv (FIG. 4A y FIG. 4B). En un experimento posterior, se midió la destrucción de las células tumorales 7 días después de la transducción con un MOI de 10. Se calculó el número total de células CAR+ y se incubaron con células K562.CD19 o Raji en proporciones E:T de 0,5 y 1, respectivamente. Células CAR T generadas utilizando una mezcla de partículas individuales con CD80 o CD58. De manera similar, la mayor destrucción se observó con partículas compuestas por al menos CD80 además de CD3scfv, incluyendo CD80+CD58 (FIG. 4C y FIG. 4D). En un experimento adicional se determinó el efecto de las células CAR T generadas con una sola partícula lentiviral que tenía tanto CD80 como CD58. La destrucción de las células tumorales se midió 7 días después de la transducción con un MOI de 10. Se calculó el número total de células CAR+ y se incubaron con células K562.CD19 o Nalm6 en proporciones E:T de 1:1, respectivamente. La partícula dual CD80+CD58 proporcionó la mayor función citotóxica (FIG. 4E y FIG. 4F).

[0556] Este estudio demostró que las partículas CD3scfv+CD80+CD58 indujeron la mayor diferenciación de células T y la mayor producción de citoquinas con el MOI más bajo. Las partículas CD3scfv+CD80+CD58 tuvieron además la mayor unión a las células T. Además, este estudio demostró que las partículas CD3scfv+CD80+CD58 proporcionaron la mayor función citolítica in vitro.

Ejemplo 4

[0557] Este ejemplo muestra el control tumoral mediante la transducción in vivo de células T con una partícula lentiviral con CD3scfv o CD3scfv+CD80. La partícula lentiviral contiene un polinucleótido que codifica un CAR anti-CD19. La partícula lentiviral se administró mediante inyección intravenosa en ratones NSG MHCII KO. Los ratones utilizados en el estudio eran inmunodeprimidos y contenían células T humanas injertadas y células B humanas circulantes.

Diseño del estudio

Preparación del virus, cepa animal, líneas celulares

[0558] Se utilizaron 11 ratones hembras NSG MHCII KO (laboratorio Jackson) que se alojaron siguiendo las directrices institucionales (Centro de Investigación Oncológica Fred Hutchinson).

Protocolo del estudio

[0559] Se aclimataron 11 ratones hembras NSG MHCII KO durante una semana tras su recepción. El día -7, se extrajo sangre de todos los ratones para realizar un análisis de citometría de flujo con el fin de cuantificar el grado de humanización. Los ratones se aleatorizaron según sus niveles totales de CD3 humano en los grupos de tratamiento descritos en la tabla 5.

Tabla 5: Grupos de tratamiento del estudio

Grupo	N	Tipo de virus	Vía de administración*	Dosis del virus (unidad de título)
1	6	CD3scfv	IV	50 millones de TU Día 0
2	5	CD3scfv+CD80	IV	50 millones de TU Día 0

Cronograma del estudio

[0560] En el día 0 del estudio (SD0), se inyectaron 20×10^6 PBMC en la cavidad intraperitoneal. A continuación, se administraron a los ratones partículas de virus según la tabla anterior, seguido de una provocación con 5×10^5 células tumorales Nalm6 luciferasa+ por vía intravenosa. Se midió la carga tumoral durante la duración del estudio. En el SD11, se extrajo sangre y se midieron las células CAR T.

[0561] En el SD75, los ratones supervivientes fueron sometidos a una nueva exposición con 5×10^6 células Nalm6.

Resultados y conclusiones

[0562] El día 11 del estudio, se extrajo sangre de ambos grupos. El nivel de células CAR T en la sangre fue mayor en el grupo tratado con partículas CD3scfv+CD80 en comparación con el grupo tratado con partículas CD3scfv (FIG. 5A). El grupo tratado con partículas CD3scfv+CD80 también fue capaz de reducir la carga tumoral durante el desafío inicial y el redésafío posterior en comparación con el grupo tratado con partículas CD3scfv (FIG. 5B y FIG. 5C).

[0563] En resumen, cuando se administraron por vía intravenosa, las partículas de lentivirus modificadas con CD3scfv y CD3scfv+CD80 transducían con éxito las células T in vivo. Aunque ambos grupos redujeron la carga tumoral tras el desafío inicial y el redésafío posterior, las partículas con la molécula coestimuladora CD80 proporcionaron una mayor eficacia antitumoral y una mejor respuesta inmunitaria antitumoral.

Ejemplo 5

[0564] Este ejemplo muestra la transducción con partículas lentivirales modificadas genéticamente, tal como se describe en el presente documento, para transducir células T en un periodo de incubación corto. Sin pretender estar limitado por la teoría, este estudio proporciona pruebas de concepto que respaldan que las partículas modificadas genéticamente descritas pueden ser útiles en un sistema intravenoso extracorpóreo.

[0565] Se descongelaron PBMC de tres donantes sanos y se cultivaron con partículas vectoriales que contenían una carga útil anti-CD19 CAR-mCherry pseudotipada con

CD3scfv+cocal o CD3scfv+CD80+CD58+Cocal, tal como se describe en general en el Ejemplo 2. Tras el tiempo indicado, las células se lavaron en un medio sin suero que contenía IL2, suero humano ab, HEPES y glutamina. A continuación, las células se sembraron en 1 ml de medio sin suero con IL-2 en una placa de 24 pocillos no tratada con TC. Tres días después, se recogieron las células y se midió la expresión de CD25 mediante citometría de flujo en células T viables (FIG. 6A). Las células restantes se lavaron y se volvieron a sembrar en 1 ml de medio fresco que contenía IL-2. Cuatro días después (día 7 después de la transducción), se analizaron las células T viables mediante citometría de flujo para determinar la expresión de CAR en la superficie (FIG. 6B). El porcentaje de CAR se midió mediante tinción con mAb anti-CD19 y expresión de mCherry.

[0566] Como se muestra en las FIG. 6A-6B, las partículas vectoriales que comprenden moléculas de activación, coestimulación y adhesión (por ejemplo, partículas CD3scFv+CD80+CD58) transducían eficazmente las células T tras períodos de incubación cortos en mayor medida que las partículas que comprenden un CD3scFv sin componentes de coestimulación y adhesión. Estos resultados indican que las partículas vectoriales descritas en el presente documento pueden permitir la transducción de células T durante períodos de incubación cortos ex vivo, por ejemplo, en un sistema de circuito cerrado y/o extracorpóreo.

Ejemplo 6

[0567] Este Ejemplo muestra el potencial de transducción de partículas lentivirales que comprenden una proteína de envoltura mutada (ciega). Las proteínas de envoltura, como VSV-G o Cocal, pueden mutarse de tal manera que no puedan unirse al receptor LDL. Estas modificaciones pueden mejorar la especificidad de las partículas lentivirales y reducir o eliminar la transducción fuera del objetivo.

[0568] Se cultivaron células SupT1 con partículas vectoriales que contenían una carga útil anti-CD19 CAR-mCherry, generadas generalmente como se describe en el Ejemplo 2. En concreto, se añadieron 0,02 uL de partículas concentradas a $3,75 \times 10^4$ células SupT1 y se evaluó la expresión de CAR tres días después. Las células se cultivaron en las siguientes condiciones:

Condición	Descripción de las partículas
α CD3/CD58/CD80; no VSVG	<i>CD3scFv+CD80+CD58; sin envoltura</i>
VSVG	Solo VSV-G
VSVG (R354Q)	Solo VSV-G (R354Q)
VSVG (K47Q)	Solo VSV-G (K47Q)
α CD3/CD58/CD80; VSVG	CD3scFv+CD80+CD58; VSV-G

α CD3/CD58/CD80; VSVG (R354Q)	CD3scFv+CD80+CD58; VSV-G (R354Q)
α CD3/CD58/CD80; VSVG (K47Q)	CD3scFv+CD80+CD58; VSV-G (K47Q)

[0569] Como se muestra en la fila superior de la Figura 7A, las partículas lentivirales que comprenden solo las envolturas mutantes VSV-G cegadas (sin CD3scFv+CD80+CD58) mostraron una transducción muy reducida de las células SupT1 en comparación con un control VSV-G no cegado. La fila inferior de la Figura 7A muestra que la adición de moléculas de activación, coestimulación y adhesión en partículas que comprenden proteínas de envoltura mutantes VSV-G cegadas dio lugar a un aumento de la transducción.

[0570] Con el fin de confirmar los resultados observados con una línea de células T, se repitió el experimento con PBMC. El día 0, se descongelaron PBMC de dos donantes y se colocaron 2×10^6 células en los pocillos de una placa de 24 pocillos. Se añadieron partículas vectoriales que contenían una carga útil anti-CD19 CAR-mCherry, generadas en general como se describe en el Ejemplo 2, a cada pocillo que contenía células según la siguiente tabla.

Condición	Descripción de las partículas
α CD3/CD58/CD80; no VSVG	<i>Anti-CD3scFv+CD80+CD58; sin envoltura</i>
VSVG	Solo VSV-G
VSVG (R354Q)	Solo VSV-G (R354Q)
VSVG (K47Q)	Solo VSV-G (K47Q)
α CD3/CD58/CD80; VSVG	Anti-CD3scFv+CD80+CD58; VSV-G
α CD3/CD58/CD80; VSVG (R354Q)	Anti-CD3scFv+CD80+CD58; VSV-G (R354Q)
α CD3/CD58/CD80; VSVG (K47Q)	Anti-CD3scFv+CD80+CD58; VSV-G (K47Q)

[0571] El día 3, se cambió el medio, se volvieron a sembrar las células con medio fresco y se tomaron muestras para evaluar la transducción mediante citometría de flujo. Como se muestra en las figuras 7B-7C, las partículas lentivirales que comprendían envolturas VSV-G cegadas dieron lugar a una transducción reducida en comparación con el control VSV-G no cegado tanto en las células T CD4 (Figura 7B) como en las CD8 (Figura 7C). Además, la adición de CD3scFv+CD80+CD58 a las partículas lentivirales dio lugar a un aumento de la transducción en comparación con las partículas lentivirales sin CD3scFv+CD80+CD58. Además, las partículas lentivirales que comprendían CD3scFv+CD80+CD58 sin VSV-G también mostraron una transducción deficiente.

[0572] El día 5 se tomaron muestras adicionales para evaluar la transducción mediante citometría de flujo. La expresión de CAR el día 5 fue similar a la expresión el día 3 (datos no mostrados).

[0573] Los resultados de este estudio respaldan la hipótesis de que las partículas lentivirales que comprenden una proteína de envoltura ciega y moléculas de activación, coestimulación y adhesión son capaces de transducir células T primarias.

Ejemplo 7

[0574] Este ejemplo muestra la expansión de células T no transducidas tras la administración de una partícula lentiviral con CD3scfv o CD3scfv+CD80+CD58. La partícula lentiviral contiene un polinucleótido que codifica un CAR anti-CD19. La partícula lentiviral se administró mediante inyección intravenosa en ratones.

Diseño del estudio

[0575] Los ratones se aclimataron durante una semana tras su recepción. El día -7, se extrajo sangre de todos los ratones para realizar un análisis de citometría de flujo con el fin de cuantificar el grado de humanización. Los ratones se aleatorizaron según sus niveles totales de CD3 humano en los grupos de tratamiento descritos en la tabla siguiente.

Tipo de virus	Vía administrativa	Dosis de virus (unidad de título)
CD3scfv	IV	100 millones de TU
CD3scfv	IV	50 millones de TU
CD3scfv+CD58+CD80	IV	100 millones de TU
CD3scfv+CD58+CD80	IV	50 millones de TU
CD3scfv+CD58+CD80	IV	25 millones de TU

Cronograma del estudio

[0576] En el día 0 del estudio (SD0), se administró a los ratones una dosis de partículas víricas según la tabla anterior. En el SD11, se extrajo sangre y se midieron las células T CAR negativas.

Resultados y conclusiones

[0577] En el día 11 del estudio, se extrajo sangre de ambos grupos. El nivel de células T CAR negativas en la sangre fue mayor en el grupo tratado con partículas CD3scfv+CD58+CD80 y fue dependiente de la dosis en comparación con el grupo tratado con partículas CD3scfv (FIG. 8). Estos resultados indican que, cuando se administran por vía intravenosa, las partículas de lentivirus modificadas con CD3scfv+CD58+CD80 parecen activar y expandir incluso las células T no transducidas in vivo. Sin querer ceñirnos a la teoría, esta activación de las células T no transducidas

podría permitir una dosis más baja de partículas de lentivirus modificadas, ya que las células no transducidas pueden mostrar actividad antitumoral.

Ejemplo 8

[0578] Los ejemplos muestran que la combinación de moléculas coestimuladoras CD80, anti-CD3scFv y una proteína de adhesión CD58 expresadas como un único polipéptido de fusión (FIG. 9A) mejora aún más la activación y la transducción de las células T. Se generaron partículas que contenían el polipéptido de fusión. Se examinó la capacidad de estas partículas para activar y transducir PBMC humanas no estimuladas en comparación con partículas que expresaban las tres proteínas por separado y con partículas que expresaban un polipéptido de fusión CD80/CD58 (FIG. 9B) y anti-CD3scFv por separado.

Producción de virus

[0579] Todas las soluciones utilizadas fueron las mismas que las descritas en el Ejemplo 1. El virus se produjo tal como se describe en el Ejemplo 1.

[0580] Lista de preparaciones de virus realizadas para el estudio:

1. α -CD3scfv+CD80+CD58 expresado como un único polipéptido de fusión (fusión triple N.º 498)
2. CD80+CD58 expresado como un único polipéptido de fusión y α -CD3scfv expresado por separado (fusión doble N.º 455)
3. α -CD3scfv+CD80+CD58 expresado por separado “Separado”

Transducción y análisis de PBMC

[0581] Se incubaron tres donantes sanos de PBMC con las partículas lentivirales indicadas con anterioridad a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 en tampón de cloruro sódico al 0,9 % a una concentración de 20e6 células/ml en un volumen total de 100 μ l en una placa de 96 pocillos con fondo en U. Tras 1 hora de incubación, las células se lavaron, se tiñeron con anticuerpos y se analizaron mediante citometría de flujo. El porcentaje de células con Cocal unido y la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI) de Cocal se muestran en la FIG. 10. Las células analizadas por citometría de flujo se seleccionaron en función de su viabilidad y de los marcadores CD3+, CD14-, CD56-, CD8+ y Cocal+. Se observaron datos similares para las células T CD4+ (datos no mostrados).

Resultados y conclusiones

[0582] Para evaluar si las partículas lentivirales con moléculas coestimuladoras y moléculas de adhesión α -CD3scfv+CD80+CD58 expresadas como un único polipéptido de fusión mejoran la activación y la transducción de las células T, se añadieron las partículas lentivirales a PBMC de tres donantes sanos de PBMC a varios MOI y a 2E6 células/ml en medio RPMI. Tres días después, se eliminó el virus y se lavaron las

células, se les añadió medio fresco y se analizaron mediante citometría de flujo para detectar el marcador de activación CD25. Las células se seleccionaron en función de su viabilidad y de la expresión de CD3+, CD4+ o CD8+. Las partículas “#498” de α -CD3scfv+CD80+CD58 expresadas como un único polipéptido de fusión activaron potentemente las células T CD4+ (FIG. 11A y FIG. 11C) y CD8+ (FIG. 11B y FIG. 11D). Además, las partículas de triple fusión “#498” activaron las células T CD4+ (FIG. 11A y FIG. 11C) y CD8+ (FIG. 11B y FIG. 11D) a través de la regulación al alza de CD25 a una dosis mucho menor en comparación con las partículas de doble fusión “#455” y las partículas lentivirales “separadas”.

[0583] Para caracterizar aún más la activación de las células T, se añadieron partículas lentivirales a PBMC de tres donantes sanos de PBMC a varios MOI y a 2E6 células/ml en medio RPMI. Tres días después, se recogió el sobrenadante y se midieron las citoquinas utilizando el kit V-PLEX™ Proinflammatory Panel 1 Human Kit. De forma similar a la expresión de CD25, las partículas de triple fusión “#498” fueron capaces de inducir más citoquinas asociadas a la activación de las células T, incluyendo IFN- γ , IL-2 y TNF- α , en comparación con las partículas de doble fusión “#455” y las partículas “Separate”. Se observó una mayor producción de IFN- γ en PBMC no estimuladas a dosis más bajas (FIG. 12A). Además, las partículas de triple fusión “#498” indujeron una producción robusta de IL-2 y TNF- α en comparación con las partículas “Fusion-455” y “Separate” (FIG. 12B y FIG. 12C). Los datos muestran que las partículas de triple fusión “#498” inducen eficazmente la producción de citoquinas en PBMC no estimuladas in vitro en comparación con “#455”, la fusión dual, y las partículas “Separadas”.

[0584] Se perfilaron los subtipos de células T generados por las partículas. Las células se evaluaron utilizando marcadores CCR7, CD27, CD28 y CD57. Se añadieron partículas lentivirales a PBMC de tres donantes sanos de PBMC a varios MOI y a 2E6 células/ml en medio RPMI. Siete días después de la transducción, se lavaron las células y se analizó la expresión del marcador de superficie CAR mediante citometría de flujo. Las células se seleccionaron en función de su viabilidad, CD3+, CD4+ o CD8+, CAR+.

[0585] Las células T de memoria no diferenciadas terminalmente son CCR7+CD27+CD28+. Las partículas que contienen triple fusión “#498” produjeron un mayor porcentaje de células T CAR+ similares a las de memoria CCR7+CD27+CD28+ en comparación con las partículas de doble fusión “#455” y “Separadas” (FIG. 13A y FIG. 13C).

[0586] Se cree que las células T CAR+ similares a las de memoria CCR7+CD27+CD28+ tienen una mayor longevidad y capacidad proliferativa y se correlacionan con mejores respuestas antitumorales in vivo. Las partículas de triple fusión “#498” produjeron un porcentaje menor del marcador de senescencia CD57 con

un MOI de 2 en comparación con las partículas de doble fusión “#455” y “Separadas” (FIG. 13B y FIG. 13D).

Ejemplo 9

[0587] Este ejemplo muestra la activación de células T y la producción de IFN γ tras la transducción in vivo de células T mediante una partícula lentiviral que presenta el polipéptido de triple fusión N.º 498, en comparación con la fusión doble N.º 455 y las partículas “separadas” descritas con anterioridad. La partícula lentiviral contiene un polinucleótido que codifica un CAR anti-CD19.

[0588] En el día -4 del estudio, se inyectaron en la vena caudal de ratones NSG MHC I/II dKO 2,5E5 células Nalm6 que expresaban luciferasa de luciérnaga (ffluc) (FIG. 14A). Tres días después (día -1 del estudio), se obtuvieron imágenes de los ratones mediante bioluminiscencia y se aleatorizaron en grupos de estudio según la carga tumoral (flujo total). Ese mismo día, todos los ratones fueron humanizados mediante la inyección intraperitoneal de 20E6 PBMC humanas en 100 μ l de PBS estéril 1X. Los ratones utilizados en el estudio estaban inmunodeprimidos y contenían células T humanas injertadas y células B humanas circulantes.

[0589] Al día siguiente (día 0 del estudio), los ratones fueron tratados mediante inyección intraperitoneal con diferentes dosis de partículas lentivirales que presentaban:

1. α -CD3scfv+CD80+CD58 expresado como un polipéptido de fusión único “#498” triple fusión;
2. CD80+CD58 expresado como un polipéptido de fusión único y α -CD3scfv expresado por separado “#455” doble fusión; o
3. α -CD3scfv+CD80+CD58 expresado por separado “Separado”.

[0590] Un grupo de control trató a los ratones con 1xPBS (Neg) mediante inyección intraperitoneal. A continuación, se pesó a los ratones dos veces por semana durante todo el estudio para controlar los cambios en el peso corporal y se les tomaron imágenes semanalmente para controlar la carga tumoral. Se extrajo sangre de los ratones los días 4, 11, 18, 25 y 32 del estudio para realizar un análisis de citometría de flujo. Se analizaron los marcadores de activación CD25 (FIG. 14B) y CD71 (FIG. 14C) en las células T CD3+ en el día 4 del estudio. Cuatro días después del tratamiento con partículas lentivirales (día 4 del estudio), se extrajo suero de la sangre y se midieron los niveles de IFN γ en el suero utilizando el kit V-PLEX™ proinflammatory panel 1 human (Mesoscale Discovery) (FIG. 14D).

[0591] La sangre de la aféresis se lavó en la máquina Lupagen™ y se incubó con partículas lentivirales a un MOI de 2 durante 1 hora en solución salina. La partícula lentiviral contiene un polinucleótido que codifica un transgén anti-CD19-mCherry.

[0592] A continuación, se lavaron las células unidas a las partículas para eliminar las partículas no unidas y generar el material “final”. Las células unidas a las partículas se evaluaron mediante tinción para Cocal en diversas poblaciones celulares (células T CD4+, células T CD8+, células T NK, células NK, células NK CD56+, monocitos, células B y otros MFI) y se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestra la intensidad de fluorescencia media geométrica de Cocal (FIG. 15A-15C). Se observó la unión más fuerte con las partículas que presentaban la triple fusión “#498” en comparación con las partículas que presentaban la doble fusión “#455”.

Ejemplo 10

[0593] Este ejemplo muestra respuestas antitumorales in vivo a partículas lentivirales que expresan una proteína de fusión de moléculas de coestimulación y adhesión utilizando el sistema Lupagen™.

[0594] En el día -4 del estudio, se inyectaron en la vena caudal de ratones NSG MHC I/II DKO 2,5E5 células Nalm6 que expresaban GFP/luciferasa de luciérnaga (ffluc). Tres días después (día -1 del estudio), se obtuvieron imágenes de los ratones mediante bioluminiscencia y se asignaron aleatoriamente a los grupos de estudio según la carga tumoral (flujo total). Los días 0 y 1 del estudio, se inyectó a los ratones PBMC de dos donantes diferentes, ya fuera después del lavado con Lupagen™ o tras la incubación con partículas lentivirales que contenían polipéptidos de fusión doble “#455” o triple “#498” en la superficie de las partículas lentivirales. El día 8 del estudio y cada semana durante el estudio, se obtuvieron imágenes de los ratones mediante bioluminiscencia con el sistema IVIS™ Spectrum para analizar la carga tumoral (flujo total) (FIG. 16C y 16D). Se realizaron extracciones sanguíneas semanales en serie para realizar análisis de citometría de flujo y evaluar la expansión y persistencia de las células CAR-T (FIG. 16A y 16B). La progresión de la enfermedad se controló mediante imágenes de bioluminiscencia una vez a la semana después de la inyección subcutánea de d-luciferina utilizando el sistema de imágenes IVIS™ (FIG. 16E).

Ejemplo 11

[0595] Este ejemplo muestra la selección de partículas lentivirales que presentan variaciones de polipéptidos de doble fusión CD58 y CD80, y la selección de partículas lentivirales que presentan variaciones de polipéptidos de triple fusión CD58, CD80 y anti-CD3 scFv.

[0596] Se obtuvieron PBMC humanas criopreservadas de donantes normales de AllCells™. Las PBMC humanas se cultivaron en medio de crecimiento de células T (TCGM) (RPMI1640 + 5 % de suero HuAB + 1x GlutaMax + HEPES). Para la transducción lentiviral, se añadió el virus a las células PBMC durante 3 días. A

continuación, se interrumpieron la estimulación y la infección lentiviral lavando y resiembrando las PBMC en medio TCGM fresco.

[0597] Para analizar la activación de las células T, se sedimentaron aproximadamente $0,1 \times 10^6$ células tras el periodo de producción de 3 días tras la transducción lentiviral descrita con anterioridad. A continuación, las células se analizaron por citometría de flujo de la siguiente manera. Las células se resuspendieron en Fixable Viability Dye eFluor 780 en PBS durante 10 minutos y, a continuación, se lavaron con tampón de tinción celular. La activación de las células T se midió mediante la detección del marcador hCD25 utilizando un anticuerpo anti-CD25-PE/Cy7 diluido 1:100 en tampón de tinción celular.

[0598] Para medir los niveles de expresión de CAR y la eficiencia de transducción, se sedimentaron aproximadamente $0,1 \times 10^6$ células tras un periodo de producción de 7 días tras la transducción lentiviral. A continuación, las células se analizaron mediante citometría de flujo de la siguiente manera. Las células se resuspendieron en Fixable Viability Dye eFluor 780 en PBS durante 10 minutos y, a continuación, se lavaron con tampón de tinción celular. La expresión superficial de CAR FMC63 se detectó utilizando un anticuerpo anti-ID-FITC diluido 1:100 en tampón de tinción celular. Las células se sedimentaron tras una incubación de 20 minutos en la oscuridad, seguida de dos lavados con tampón de tinción celular. Todos los análisis de citometría de flujo se realizaron en un citómetro de flujo Attune™ NxT y se analizaron con FlowJo™.

[0599] Se contaron las células T primarias transducidas que expresaban CAR FMC63 en el día 7, se resuspendieron a una densidad celular igual a $0,4 \times 10^6$ células CAR+ /ml en medio de ensayo celular (RPMI1640 + 10 % FBS). Se añadieron 100 µl de células CAR+ (40 000 células CAR+) a una placa de 96 pocillos de fondo plano que contenía 10 000 células Nalm6 y se incubaron a 37 °C para obtener una relación efector/objetivo de 4:1. Las células CAR+ se diluyeron en serie en medio de ensayo celular antes de la siembra para obtener relaciones efector/objetivo más bajas. La destrucción de las células diana se analizó en un sistema de análisis de células vivas IncuCyte™. Se tomaron imágenes de cada pocillo cada 6 horas y se cuantificó el número de células Nalm6 para evaluar la cinética de la citotoxicidad de las células T. Tras 24 horas, se recogió el sobrenadante de cada pocillo para medir las citoquinas según el protocolo del fabricante. Se realizó un seguimiento de la lisis de las células diana Nalm6 durante más de 4 días. La línea celular diana Nalm6 se marcó de forma estable con mKate2 nuclear mediante transducción lentiviral con el reactivo IncuCyte™ NucLight Red Lentivirus.

Resultados

[0600] Las PBMC de donantes sanos se transducían con lentivirus que portaban un transgén CAR FMC63 y que expresaban diversas proteínas de fusión dual modificadas

en superficie con un MOI de 2 y 5. La activación temprana se determinaba en función de la tinción con hCD25 en el día 3 (FIG. 17), y el nivel de expresión de CAR se medía mediante tinción con un anticuerpo anti-FMC63 conjugado con FITC (FIG. 18). Las células CAR-T se expusieron a Nalm6-NIR (FIG. 19A-19D) para comparar la cinética de destrucción y los niveles de producción de citoquinas dependientes del objetivo (FIG. 20). Las concentraciones de citoquinas proinflamatorias en el sobrenadante del cocultivo tras 24 horas desde el inicio del ensayo, en combinación con la cinética de destrucción, indican que las células CAR-T que comprenden la construcción de fusión dual #455 y el scFv anti-CD3 expresado por separado obtuvieron los mejores resultados en el ensayo funcional.

[0601] Con una transducción MOI muy baja (MOI = 0,5 y 1), las partículas lentivirales producidas utilizando anti-CD3 scFv y plásmidos de doble fusión promovieron la activación de las células T en el día 3 (FIG. 21), mejoraron la eficiencia de la transducción y aumentaron la expresión de CAR en el día 7 (FIG. 22).

[0602] Las partículas con ingeniería de superficie de proteína de triple fusión “#498” se compararon con las partículas de doble fusión “#455” en la transducción de PBMC utilizando MOI alto y bajo (MOI = 1 y 10). Las partículas lentivirales producidas utilizando las versiones de triple fusión #479, #496 y #498 mejoraron la activación temprana de las células T en las PBMC (FIG. 23). Las partículas #496 y #498 obtuvieron mejores resultados en cuanto a la eficiencia de transducción y la expresión de CAR en el día 7 (FIG. 24). En este experimento, la partícula #498 tuvo el efecto más significativo en la expansión de las células T CAR+ (FIG. 25).

Ejemplo 12

[0603] Este ejemplo muestra la activación y transducción de células T con partículas lentivirales que presentan un polipéptido de triple fusión CD58, CD80 y anti-CD3 scFv.

[0604] Se cultivaron PBMC humanas de tres donantes normales en medio de crecimiento de células T (TCGM) (RPMI1640 + 5 % de suero HuAB + 1x GlutaMax + HEPES). Para la transducción lentiviral, se añadieron partículas lentivirales a las células PBMC.

[0605] Para analizar la activación de las células T, las células se sedimentaron después de 3 días y se analizaron mediante citometría de flujo. La activación de las células T se midió mediante la detección del marcador hCD25 utilizando un anticuerpo anti-CD25-PE/Cy7 diluido 1:100 en tampón de tinción celular. Para medir los niveles de expresión de CAR y la eficiencia de la transducción, las células se sedimentaron después de un periodo de producción de 7 días tras la transducción lentiviral. A continuación, las células se analizaron mediante citometría de flujo. Se detectó la expresión superficial del CAR anti-CD19 y todos los análisis de citometría de flujo se realizaron en un citómetro de flujo

Attune™ NxT y se analizaron con FlowJo™. Se contaron las células T primarias transducidas en el día 7 que expresaban el CAR anti-CD19, se resuspendieron y se añadieron a las células tumorales Nalm6. La destrucción de las células Nalm6 diana se analizó en un sistema de análisis de células vivas IncuCyte™. Se tomaron imágenes de cada pocillo cada 6 horas y se cuantificó el número de células Nalm6 para evaluar la cinética de la citotoxicidad de las células T. Después de 24 horas, se recogió el sobrenadante de cada pocillo para medir las citoquinas según el protocolo del fabricante.

[0606] Se pusieron en contacto PBMC de donantes sanos (de tres donantes) durante menos de una hora con lentivirus que portaban un transgén CAR anti-CD19 y que mostraban proteínas de trifusión modificadas en superficie a un MOI de 2 (FIG. 28A). Se observó una unión consistente y eficaz de las células T a las partículas lentivirales modificadas, que se midió mediante el porcentaje de células T CD3+ que dieron positivo en la tinción para Cocal (FIG. 28B). Se observó una unión selectiva de las células T en un cambio en el pico de tinción de Cocal para las células T CD3+ en relación con las células T CD3- (FIG. 28C). La activación se determinó basándose en la tinción de hCD25 en el día 3 (FIG. 28D) y se midió el nivel de expresión de CAR (FIG. 28E). Las partículas lentivirales modificadas demostraron una avidéz y selectividad robustas para la unión de las células T tras un cultivo de corta duración (< 1 hora). Las PBMC transducidas se cultivaron con células tumorales Nalm6. En concreto, las células T CAR+ anti-CD19 se estimularon en serie con células tumorales Nalm6 cada 2-3 días. Se midieron las células tumorales Nalm6 totales a lo largo del tiempo utilizando un IncuCyte®, que proporciona una medición de la destrucción de las células tumorales a lo largo del tiempo (FIG. 29). Este ensayo mide la capacidad de las células CAR T para expandirse y destruir múltiples células tumorales a lo largo del tiempo y demostró que las células CAR T anti-CD19 generadas con partículas de lentivirus que expresaban una proteína de trifusión CD58, CD80 y anti-CD3 scFv demostraron una destrucción en serie in vitro.

[0607] En un estudio de neoplasias hematológicas malignas en un modelo de xenoinjerto tumoral, el día -4 se inyectaron por vía intravenosa $2,5 \times 10^5$ células Nalm6 en ratones NSG MHCI/II KO. El día -1 del estudio, se inyectaron 20×10^6 PBMC en la cavidad intraperitoneal. En el día 0 del estudio, se administró a los ratones partículas víricas que presentaban una proteína de triple fusión CD58, CD80 y anti-CD3 scFv (FIG. 30A).

[0608] Cuatro días después de la administración de partículas lentivirales, se recogieron las células y se midió la expresión de los marcadores de activación CD25 (FIG. 30B) y CD71 (FIG. 30C) y la producción de la citoquina IFN- γ (FIG. 30D) mediante citometría de flujo en células T CD3+ viables en sangre. Se analizó la expansión de las células T CAR a dosis de 10 millones y 50 millones de unidades transductoras (TU). El día 11, se

analizaron mediante citometría de flujo las células T CAR+ anti-CD19 totales encontradas en la sangre para determinar la expresión de CAR en la superficie (FIG. 30E). La carga tumoral se evaluó como flujo total y se midió durante la duración del estudio utilizando un sistema de imagen in vivo (IVIS®) (FIG. 30F).

Ejemplo 13

[0609] Este Ejemplo analizó la transducción de células T mediante una partícula lentiviral que presentaba una construcción de doble fusión (n.º 455) o una construcción de triple fusión (n.º 498). Las FIG. 32H-32I muestran la carga tumoral total (flujo total) a lo largo de los 28 días del estudio en la sangre de ratones inyectados con PBMC del donante 1 (FIG. 32H) o del donante 2 (FIG. 32I) tras la incubación con Lupagen™ con PBMC de control no tratadas, partículas lentivirales que presentan una construcción de fusión doble “#455” o triple “#498”. Los datos muestran que la incubación extracorpórea de PBMC con las partículas lentivirales descritas en este documento genera potentes respuestas antitumorales in vivo. Las partículas lentivirales que mostraban una tri-fusión de CD58, CD80 y anti-CD3 scFv “#498” polipéptido mostraron una actividad antitumoral mejorada en el donante 2 con una dosis celular más baja (donante 2: se inyectaron 15e6 células; donante 1: se inyectaron 25e6 células).

[0610] En el día 49 del estudio (día 0 de la reexposición), se inyectó a los ratones, mediante inyección en la vena caudal, 2,5E5 células Nalm6 adicionales que expresaban luciferasa de luciérnaga (ffluc) para evaluar la eliminación de la reexposición al tumor (FIG. 33A). La carga tumoral se evaluó como flujo total y se midió durante la duración del estudio de reexposición para el donante 1 (D1) y el donante 2 (D2) utilizando un sistema de imagen in vivo (IVIS®) (FIG. 33C). La FIG. 33B muestra la carga tumoral en ratones NSG MHCII KO tras la administración de células T producidas mediante incubación extracorpórea de PBMC del donante 1 (D1) o del donante 2 (D2) incubadas con partículas lentivirales que expresaban una construcción de fusión doble “#455” o triple “#498” tras la reexposición a las células tumorales en el día 49. Las partículas lentivirales que expresaban un polipéptido de triple fusión CD58, CD80 y anti-CD3 scFv “#498” generaron células CAR-T anti-CD19, que mostraron persistencia tras la eliminación del tumor primario y protección contra la reexposición al tumor in vivo.

Ejemplo 14

[0611] Este ejemplo muestra que la incorporación de una molécula coestimuladora en una partícula lentiviral mejora la transducción de PBMC por partículas lentivirales, tal como se generaron en el ejemplo 1.

Producción de virus

[0612] Todas las soluciones utilizadas fueron las mismas que las descritas en el Ejemplo 1. Se sembraron células 293T en matraces T175 con medio DMEM completo.

Veinticuatro horas después, se transfectaron las células. El virus se produjo tal como se describe en el Ejemplo 1. Todos los virus incluían una proteína de envoltura Cocal.

[0613] Lista de preparaciones de virus realizadas para el estudio (los virus contenían una carga útil CAR anti-CD19):

1. Solo CD3scfv

2. Proteínas CD3scfv, CD80 y CD58 expresadas por separado (“proteína triple”)

Transducción de PBMC y tinción para citometría de flujo

[0614] Se descongelaron 50×10^6 PBMC y se diluyeron a 2×10^6 células/ml en medio completo (por ejemplo, RPMI u Optimem). Se añadió IL-2 hasta una concentración final de 50 UI/ml.

[0615] Se añadieron 500 μ l (1e6 células) a los pocillos de una placa de 48 pocillos no tratada con TC. Se añadió el vector a los pocillos con un MOI = 10, 5 y 2 según el título de SupT1 ddPCR y se colocaron las placas en una incubadora a 37 °C.

[0616] Después de 3 días, se lavó el vector y se sustituyó por 500 μ l de medio RPMI fresco + IL-2 (50 UI/ml). Se mezclaron las células y se añadieron 100-300 μ l a los pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo en V para el análisis por citometría de flujo de activación. A continuación, las células se lavaron con 200 μ l de tampón FACS. Los pellets celulares se resuspendieron en 50-100 μ l de PBS con LiveDead Stain (1:1000) y se incubaron a 4 °C durante 20 minutos, seguido de otro lavado con 200 μ l de tampón FACS. Las células se resuspendieron en 50 μ l de tampón FACS + cóctel de tinción superficial, se incubaron durante 30 minutos a 4 °C y se lavaron en 200 μ l de tampón FACS.

Resultados y conclusiones

[0617] Para evaluar si las partículas lentivirales con moléculas coestimuladoras y de adhesión expresadas por separado pueden activar mejor las células T humanas, se añadieron las partículas vectoriales a PBMC humanas a varios MOI. Tres días después, se eliminó el virus y se proporcionó a las células un medio fresco, y se analizaron para detectar el marcador de activación CD25. Las partículas de proteína Tri activaron potentemente las células T CD8 en comparación con CD3scfv solo (FIG. 36A). Además, la regulación al alza de CD25 fue dependiente de la dosis (FIG. 36A). Las partículas lentivirales solo CD3scfv indujeron niveles mínimos de CD25 en comparación con las partículas de proteína Tri (FIG. 36A). Para determinar si las partículas lentivirales con moléculas coestimuladoras y/o de adhesión han mejorado la unión de las partículas a las células T, las partículas se cultivaron con PBMC durante 6 horas y luego se analizaron para detectar moléculas asociadas a las partículas en las células T (Cocal). La expresión separada de CD58, CD80 y un scFv anti-CD3 aumentó la tinción con Cocal (FIG. 36B).

[0618] Para examinar la transducción, 7 días después de la transducción, se analizaron muestras para determinar la expresión de CAR anti-CD19. Las partículas de proteína Tri fueron capaces de transducir PBMC no estimuladas, mientras que las partículas de CD3scfv solo transducían PBMC no estimuladas en menor medida (FIG. 36C). Además, la transducción se produjo de forma dependiente de la dosis tanto para las células T CD4+ como para las CD8+ (FIG. 36C). Los datos muestran que las partículas de proteína Tri activan y transducen eficazmente las PBMC no estimuladas in vitro en comparación con solo CD3scfv. Es importante destacar que las partículas mejoradas dan lugar a un aumento del número de células T CAR+ (FIG. 36C, paneles derechos: células CAR+ totales).

[0619] Para caracterizar mejor la activación de las células T, tres días después de la adición del vector, se analizaron muestras para determinar la expresión de citoquinas. Las partículas de proteína Tri fueron capaces de inducir la producción de IFN- γ en PBMC no estimuladas a dosis más bajas, mientras que las partículas de CD3scfv solo transducían las PBMC no estimuladas en menor medida (FIG. 36D). Además, las partículas de proteína Tri indujeron IL-2 y TNF- α de forma robusta, mientras que CD3scfv solo no lo hizo (FIG. 36D). Los datos muestran que las partículas de proteína Tri inducen eficazmente la producción de citoquinas en PBMC no estimuladas in vitro en comparación con CD3scfv solo.

[0620] A continuación, las PBMC transducidas se cultivaron con células tumorales Nalm6. En concreto, las células T CAR+ anti-CD19 se estimularon en serie con células tumorales Nalm6 cada 2-3 días. Se midieron las células tumorales Nalm6 totales a lo largo del tiempo utilizando un IncuCyte®, que proporciona una medición de la destrucción de las células tumorales a lo largo del tiempo (FIG. 36E). Este ensayo mide la capacidad de las células CAR T para expandirse y destruir múltiples células tumorales a lo largo del tiempo y demostró que las células CAR T anti-CD19 generadas con partículas lentivirales que expresaban la “proteína Tri” demostraron una destrucción en serie in vitro en comparación con las partículas que expresaban solo CD3scfv.

[0621] Para determinar si las partículas lentivirales con moléculas coestimuladoras y/o de adhesión han mejorado la unión de las partículas a las células T, las partículas se cultivaron con PBMC durante 6 horas y, a continuación, se analizaron las moléculas asociadas a las partículas en las células T (Cocal, anti-CD3scFv, CD80 y CD58). Tanto la proteína Tri como las partículas de fusión mostraron una alta expresión de anti-CD3scFv, CD80 y CD58, y solo las partículas de fusión mostraron una alta tinción para CD3scfv+CD80+CD58 (datos no mostrados). Los datos muestran que la fusión de CD58v+CD3 scFv+CD80 mejora la unión de las partículas a las células T. A continuación, se analizaron las muestras para determinar la expresión de citoquinas. Las

partículas de proteína Tri fueron capaces de inducir la producción de IFN- γ en PBMC no estimuladas, mientras que las partículas de CD3scfv solo transducían las PBMC no estimuladas en menor medida (FIG. 36F). Además, las partículas de proteína Tri indujeron una producción robusta de IL-2 y TNF- α , mientras que CD3scfv solo no lo hizo (FIG. 36F). Los datos muestran que las partículas de proteína Tri modificadas en superficie inducen eficazmente la producción de citoquinas en PBMC no estimuladas en comparación con CD3scfv solo.

[0622] Para determinar si las partículas lentivirales generan diferentes subtipos de células T, se perfilaron las PBMC cultivadas con las partículas lentivirales y se seleccionaron las viables, CD4+ y CD8+. Las células se analizaron posteriormente mediante citometría de flujo y el análisis se realizó basándose en los parámetros CCR7+ y CD27+ (FIG. 36G). Las partículas de proteína Tri mostraron un aumento de la población de células T CCR7+CD27+ en comparación con el CD3 scFv solo. Se cree que las células T CAR+ similares a las de memoria CCR7+CD27+CD28+ tienen una mayor longevidad y capacidad proliferativa y se correlacionan con mejores respuestas antitumorales in vivo.

Ejemplo 15

[0623] Este ejemplo muestra la activación de las células T y la producción de IFN γ tras la transducción in vivo de células T mediante una partícula lentiviral que expresa CD58, CD80 y un scFv anti-CD3 expresados por separado, en comparación con solo CD3scfv. Las partículas lentivirales contenían un polinucleótido que codifica un CAR anti-CD19.

[0624] En el día -4 del estudio, se inyectaron en la vena caudal de ratones NSG MHC I/II dKO 2,5E5 células Nalm6 que expresaban luciferasa de luciérnaga (ffluc) (FIG. 37A). Tres días después (día -1 del estudio), se obtuvieron imágenes de los ratones mediante bioluminiscencia y se aleatorizaron en grupos de estudio según la carga tumoral (flujo total). Ese mismo día, todos los ratones fueron humanizados mediante la inyección intraperitoneal de 20E6 PBMC humanas en 100 μ l de PBS estéril 1X. Los ratones utilizados en el estudio estaban inmunodeprimidos y contenían células T humanas injertadas y células B humanas circulantes.

[0625] Al día siguiente (día 0 del estudio), los ratones fueron tratados mediante inyección intraperitoneal con diferentes dosis de partículas lentivirales que presentaban:

1. CD58, CD80 y un α -CD3 scFv expresados por separado (“proteína triple”);
2. Solo α -CD3scfv.

[0626] En un grupo de control, se trató a los ratones con 1xPBS (Neg) mediante inyección intraperitoneal. A continuación, se pesó a los ratones dos veces por semana durante todo el estudio para controlar los cambios en el peso corporal y se les tomaron imágenes semanalmente para controlar la carga tumoral. Se extrajo sangre de los

ratones los días 4, 11, 18, 25 y 32 del estudio para realizar un análisis de citometría de flujo. Se analizaron los marcadores de activación CD25 (FIG. 37B) y CD71 en las células T en el día 4 del estudio. Se realizó una extracción de sangre en el día 11 para realizar un análisis de citometría de flujo y evaluar la expansión y persistencia de las células CAR T (FIG. 37C, panel superior) y se midió el nivel de expresión de CAR mediante tinción con un anticuerpo anti-FMC63 (FIG. 37C, panel inferior). El día 6 del estudio y cada semana durante el estudio, se obtuvieron imágenes de los ratones mediante bioluminiscencia con el sistema IVIS™ Spectrum para analizar la carga tumoral (flujo total) (FIG. 37D).

Ejemplo 16

[0627] Este ejemplo muestra que la incorporación de una molécula coestimuladora y una molécula de adhesión en una partícula lentiviral mejora la transducción de PBMC por partículas lentivirales, tal como se generaron en el ejemplo 1.

Producción de virus

[0628] Todas las soluciones utilizadas fueron las mismas que las descritas en el Ejemplo 1. Se sembraron 28×10^6 células 293T en 16 frascos T175 (8 por vector) con 28×10^6 células 293T cada uno en un volumen total de 25 ml de medio DMEM completo. 24 horas después, se transfectaron las células. El virus se produjo tal como se describe en el Ejemplo 1. Todos los virus incluían una proteína de envoltura Cocal y una carga útil CAR anti-CD19.

[0629] Lista de preparaciones de virus realizadas para el estudio:

1. *CD3scfv, CD80 y CD58 expresados por separado ("proteína triple")*
2. *CD58+CD3scFv+CD80 expresados como una proteína de fusión ("fusión")*

Resultados y conclusiones

[0630] Para evaluar si las partículas lentivirales con moléculas coestimuladoras pueden activar mejor las células T humanas, se añadieron las partículas vectoriales a PBMC humanas a varios MOI. Las partículas de fusión de CD58+CD3 scFv+CD80 activaron potentemente las células T CD4+ y CD8+ en comparación con las partículas de proteína Tri (FIG. 38B). Además, la regulación al alza de CD25 fue dependiente de la dosis (FIG. 38B). Para determinar si las partículas lentivirales con una proteína de fusión singular que comprende moléculas coestimuladoras y/o de adhesión han mejorado la unión de las partículas a las células T, las partículas se cultivaron con PBMC y, a continuación, se analizaron las moléculas asociadas a las partículas en las células T (Cocal). Las partículas de fusión dieron lugar a un aumento de la tinción Cocal (FIG. 38A).

[0631] Para examinar la transducción, 7 días después de la transducción, se analizaron muestras para detectar la expresión de CAR anti-CD19. Las partículas de fusión CD58+CD3 scFv+CD80 fueron capaces de transducir PBMC no estimuladas a dosis más

bajas, mientras que las partículas de proteína Tri transducían PBMC no estimuladas en menor medida (FIG. 38C). Además, la transducción se produjo de forma dependiente de la dosis tanto para las células T CD4+ como para las CD8+ (FIG. 38C). Los datos muestran que las partículas de fusión de CD58+CD3 scFv+CD80 activan y transducen eficazmente las PBMC no estimuladas in vitro en comparación con las partículas de proteína Tri.

[0632] Para caracterizar mejor la activación de las células T, tres días después de la adición del vector, se analizaron muestras para determinar la expresión de citoquinas. Las partículas de fusión CD58+CD3 scFv+CD80 indujeron una producción robusta de IL-2 y TNF- α en comparación con las partículas de proteína Tri (FIG. 38D). Los datos muestran que las partículas de fusión CD58+CD3 scFv+CD80 inducen eficazmente la producción de citoquinas en PBMC no estimuladas in vitro en comparación con las partículas que presentan la proteína Tri.

[0633] A continuación, las PBMC transducidas se cultivaron con células tumorales Nalm6. En concreto, las células T CAR+ anti-CD19 se estimularon en serie con células tumorales Nalm6 cada 2-3 días. Se midieron las células tumorales Nalm6 totales a lo largo del tiempo utilizando un IncuCyte®, que proporciona una medición de la destrucción de las células tumorales a lo largo del tiempo. Esto demostró que las células CAR T generadas con partículas lentivirales que expresaban una proteína de fusión CD58+CD3 scFv+CD80 mostraban una mejora en la destrucción en serie in vitro en comparación con las partículas que expresaban la proteína Tri. En particular, las células CAR T generadas con las partículas de fusión (Fusion) fueron capaces de controlar de forma continua las células tumorales durante al menos 35 días. Las células CAR T generadas con las proteínas expresadas por separado (proteína Tri) mostraron un crecimiento tumoral lento a partir del día 15 aproximadamente.

[0634] Para determinar si las partículas lentivirales generaban diferentes subtipos de células T, se analizaron las PBMC cultivadas con las partículas lentivirales y se clasificaron en viables, CD4+ y CD8+. Las células se analizaron posteriormente mediante citometría de flujo basándose en los parámetros CCR7+ y CD27+. En la mayoría de los MOI probados, tanto la proteína Tri como las partículas de fusión fueron capaces de generar altos niveles de células CAR+ CCR7+ y CD27+.

Ejemplo 17

[0635] Este ejemplo muestra la activación de las células T y la producción de IFN γ tras la transducción in vivo de células T mediante una partícula lentiviral que presenta la fusión CD58+CD3 scFv+CD80, en comparación con partículas que contienen CD58, CD3 scFv y CD80 expresados por separado. La partícula lentiviral contiene un polinucleótido que codifica un CAR anti-CD19.

[0636] El día -4 del estudio, se inyectaron en la vena caudal de ratones NSG MHC I/II dKO 2,5E5 células Nalm6 que expresaban luciferasa de luciérnaga (ffluc). Tres días después (día -1 del estudio), se obtuvieron imágenes de los ratones mediante bioluminiscencia y se aleatorizaron en grupos de estudio según la carga tumoral (flujo total). Ese mismo día, todos los ratones fueron humanizados mediante la inyección intraperitoneal de 20E6 PBMC humanas en 100 µl de PBS estéril 1X. Los ratones utilizados en el estudio estaban inmunodeprimidos y contenían células T humanas injertadas y células B humanas circulantes.

[0637] Al día siguiente (día 0 del estudio), los ratones fueron tratados mediante inyección intraperitoneal con diferentes dosis de partículas lentivirales que presentaban:

1. *CD3scfv, CD80 y CD58 expresados por separado ("proteína triple")*
2. *CD58+CD3scFv+CD80 expresados como una proteína de fusión ("fusión")*

[0638] En un grupo de control, se trató a los ratones con 1xPBS (vehículo) mediante inyección intraperitoneal. A continuación, se pesó a los ratones dos veces por semana durante todo el estudio para controlar los cambios en el peso corporal y se les tomaron imágenes semanalmente para controlar la carga tumoral. Se extrajo sangre de los ratones los días 4, 11, 18, 25 y 32 del estudio para realizar un análisis de citometría de flujo. Se analizaron los marcadores de activación CD25 (FIG. 39A) y CD71 en las células T en el día 4 del estudio. Se realizó una extracción de sangre en el día 11 para realizar un análisis de citometría de flujo y evaluar la expansión y persistencia de las células CAR T (FIG. 39B, panel superior) y se midió el nivel de expresión de CAR mediante tinción con un anticuerpo anti-FMC63 (FIG. 39B, panel inferior). El día 6 del estudio y cada semana durante el estudio, se obtuvieron imágenes de los ratones mediante bioluminiscencia con el sistema IVIS™ Spectrum para analizar la carga tumoral (flujo total) (FIG. 39C). Como se muestra en la FIG. 39C, el crecimiento tumoral se controló mejor en ambas cohortes de partículas de fusión, y la dosis más alta mostró un control tumoral más sólido. Se analizó el porcentaje de supervivencia global de los ratones a lo largo del estudio. Las partículas lentivirales que presentaban partículas de fusión CD58+CD3 scFv+CD80 transducidas a 50E6 TU mostraron una mayor supervivencia global en los ratones en comparación con las partículas que presentaban la proteína Tri lentiviral.

* * *

[0639] Los títulos de las secciones utilizados en el presente documento tienen únicamente fines organizativos y no deben interpretarse como una limitación del objeto descrito. En concreto, las características descritas en una sección pueden combinarse con características de cualquier otra sección de la descripción.

[0640] A menos que se defina lo contrario, todos los términos (incluidos los términos técnicos y científicos) utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que les atribuye un experto en la técnica a la que pertenece la presente divulgación.

[0641] Las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” pretenden incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0642] Tal como se utiliza en el presente documento, “y/o” se refiere y abarca todas y cada una de las combinaciones posibles de uno o más de los elementos asociados enumerados, así como la ausencia de combinaciones cuando se interpretan de forma alternativa (o).

[0643] Todas las publicaciones y patentes mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad, como si cada publicación o patente individual se indicara específicamente y de forma individual para su incorporación por referencia. En caso de conflicto, prevalecerá la presente solicitud, incluidas las definiciones aquí contenidas. Sin embargo, la mención de cualquier referencia, artículo, publicación, patente, publicación de patente y solicitud de patente citados en el presente documento no constituye, ni debe interpretarse como un reconocimiento o sugerencia de que constituyan antecedentes válidos o formen parte del conocimiento general común en ningún país del mundo.

[0644] Si bien se han descrito y representado ejemplos ilustrativos, se apreciará que se pueden realizar diversos cambios en estos ejemplos ilustrativos sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención.