

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 437**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2015** **PCT/US2015/039892**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016** **WO16007827**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2015** **E 15818898 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020** **EP 3167058**

54 Título: **Métodos para mejorar la eficiencia de la transducción vectorial en linfocitos T**

30 Prioridad:

11.07.2014 US 201462023618 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.03.2021

73 Titular/es:

CELGENE CORPORATION (100.0%)

86 Morris Avenue

Summit, NJ 07901, US

72 Inventor/es:

LIANG, BITAO y

LIU, WEI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 813 437 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para mejorar la eficiencia de la transducción vectorial en linfocitos T

1. Campo

La divulgación del presente documento se refiere a métodos para mejorar la eficiencia de transducción de vectores en células.

2. Antecedentes

Los linfocitos T reconocen e interactúan con antígenos específicos, incluidos los antígenos asociados a tumores o específicos de tumores. Debido a que los linfocitos T son capaces de matar células tumorales, los últimos 25 años han visto un gran objeto de interés dirigir células tumorales hacia linfocitos T, bien linfocitos T específicos de antígeno o linfocitos T genéticamente modificados para expresar uno o más receptores de antígeno quimérico (CAR; véase, *p. ej.*, Eshhar, patente de EE.UU. No. 7,741,465; Eshhar, publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. 2012/0093842). Existe una necesidad en el campo de nuevos métodos para mejorar la eficiencia de la derivación de CAR a partir de linfocitos T.

3. Compendio

La invención se refiere a un método de transducción de linfocitos T primarios como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

Se describen métodos para mejorar la eficiencia de la producción de células genéticamente modificadas, por ejemplo, células inmunes, tales como linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T humanos, por ejemplo, linfocitos T primarios (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios). Sin desear estar ligado a ningún mecanismo o teoría en particular, se cree que el sistema inmunológico innato puede inhibir la etapa de transducción viral de la producción de células CAR T y, por lo tanto, inhibir la actividad del sistema inmunológico innato (*p. ej.*, inhibiendo la capacidad del sistema inmunológico innato para inhibir la transducción viral y/o posterior producción de proteína viral), se puede mejorar la derivación de células CAR T usando vectores (*p. ej.*, vectores virales, *p. ej.*, vectores retrovirales, por ejemplo, vectores lentivirales).

Los métodos proporcionados en el presente documento pueden usarse junto con cualquier tipo de célula, en particular, cualquier célula de mamífero, por ejemplo, cualquier célula humana, *p. ej.*, células usadas para terapéutica celular, *p. ej.*, terapéutica de células humanas. Ejemplos no limitantes de células en las que se pueden usar los métodos incluyen, pero no se limitan a, células citotóxicas naturales (NK) (*p. ej.*, células citotóxicas naturales de la placenta intermedia descritas en la patente de EE.UU. No. 8,263,065 o en la solicitud de EE.UU. No. 2012/0148553, células dendríticas (DC), células madre de la placenta *p. ej.*, las células madre de la placenta descritas en las patentes de EE.UU. Nos. 7,468,276; 8,057,788 y 8,202,703), células adherentes derivadas del amnios (AMDACs) (*p. ej.*, las AMDAC descritas en la patente de EE.UU. No. 8.367), linfocitos de infiltración tumoral, células de empaquetamiento viral (*p. ej.*, células 293T HEK); células madre de tipo mesenquimal (o células madre mesenquimales o células del estroma mesenquimales) de sangre del cordón umbilical, sangre de la placenta, sangre periférica, médula ósea, pulpa dentaria, tejido adiposo, tejido osteocondrial y similares; células madre embrionarias, células germinales embrionarias, células madre de la cresta neural, células madre neurales y células diferenciadas (*p. ej.*, fibroblastos, etc.). Los métodos también pueden usarse en líneas de células tumorales, *p. ej.*, con fines experimentales en modelos animales.

En determinadas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden incluir la transducción (*p. ej.*, la transducción con un retrovirus, por ejemplo, un lentivirus) células (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios). En determinadas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden incluir poner en contacto células (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) con un compuesto que es un inhibidor del sistema inmunitario innato antes, concurrentemente o después de dicha transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral). En una realización particular, la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo la transducción lentiviral) introduce en las células un ácido nucleico aislado mayor que 10 kilobases. En otra realización más, el ácido nucleico aislado transcrito a las células (*p. ej.*, mediante transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral en linfocitos T humanos primarios), por ejemplo, un vector, *p. ej.*, un vector viral, codifica una o más proteínas, por ejemplo, codifica uno o más receptores de antígenos quiméricos.

En una realización particular, el compuesto usado en los métodos descritos en el presente documento para poner en contacto dichas células (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) durante la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) es un inhibidor del sistema inmunológico innato. En una realización particular, dicho inhibidor del sistema inmunológico innato es un inhibidor de la quinasa ϵ I κ B (IKK ϵ) y/o quinasa 1 de unión a TANK (TBK1). En una realización específica, dicho compuesto es BX795. En una realización específica, dicho inhibidor del sistema inmunológico innato es un inhibidor de la proteína quinasa R (PKR). En una realización específica, dicho compuesto es 2-Aminopurina (2-AP).

En una realización de los métodos descritos en el presente documento, las células (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) se ponen en contacto con un compuesto descrito en el presente documento (*p. ej.*, BX795 o 2-AP) antes, concurrentemente o después de la transducción con un vector, por ejemplo, un vector viral (*p. ej.*, transducción

retroviral, por ejemplo transducción lentiviral). En otra realización, las células (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) se ponen en contacto con un compuesto descrito en el presente documento (*p. ej.*, BX795 o 2-AP) 30 minutos, 60 minutos, 2 horas o 3 horas antes de la transducción con un vector viral (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral). En otra realización, las células (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) se ponen en contacto con un compuesto descrito en este documento (*p. ej.*, BX795 o 2-AP) concurrentemente con la transducción con un vector viral (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) y durante un período de 2 horas, 4 horas o 6 horas a partir de entonces. En otra realización, las células (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) se ponen en contacto con un compuesto descrito en este documento (*p. ej.*, BX795 o 2-AP) durante 30 minutos, 60 minutos, 2 horas o 3 horas antes de la transducción con un vector viral (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) y concurrentemente con la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) durante un período de 2 horas, 4 horas o 6 horas a partir de entonces. En una realización específica, dicho compuesto descrito en el presente documento (*p. ej.*, BX795 o 2-AP) se usa a una concentración de 1-20 μM o mM, respectivamente. In another embodiment, said compound described herein (*e.g.*, BX795 or 2-AP) is used at a concentration of 2.5-10 μM or mM, respectively. En otra realización más, dicho compuesto descrito en el presente documento (*por ejemplo*, BX795 o 2-AP) se usa a una concentración de 4-8 μM o mM, respectivamente.

En una realización, los métodos proporcionados en el presente documento comprenden adicionalmente poner en contacto células (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) con un reactivo de transformación (*por ejemplo*, dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina) antes o concurrentemente con la transducción con un vector, por ejemplo, un vector viral. (*por ejemplo*, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral).

En una realización de los métodos descritos en el presente documento, las células (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) se ponen en contacto adicionalmente con un agente capaz de estimular un complejo receptor de células T antes de la transducción con un vector, por ejemplo, un vector viral (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral). En una realización particular, dicho agente es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En una realización particular, dicho anticuerpo o fragmento(s) de unión a antígeno se une específicamente a CD3 y/o CD28. En una realización particular, dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se acopla a un sustrato sólido (*p. ej.*, dynabeads®). En otra realización particular, dicho anticuerpo o fragmento(s) de unión a antígeno (*por ejemplo*, anti-CD3 y/o anti-CD28) no están presentes en una superficie sólida, *p. ej.*, la misma superficie sólida, sino que están presentes en disolución, o forman complejos con otro compuesto o composición que permite la presentación del anticuerpo o fragmento(s) de unión al antígeno a la célula, *p. ej.*, el anticuerpo o fragmento(s) de unión al antígeno forman complejos con un polímero, hidrogel, albúmina, y/o una molécula hidrofóbica. En determinadas realizaciones, la molécula con la que forman complejos el anticuerpo o fragmento(s) de unión al antígeno no es un adyuvante. En otra realización, dicha puesta en contacto ocurre al menos 48 horas, al menos 44 horas, al menos 36 horas, al menos 32 horas, al menos 28 horas, al menos 24 horas, al menos 20 horas, al menos 16 horas, al menos 12 horas, al menos 8 horas o al menos 4 horas antes de la transducción de dichas células con un vector, por ejemplo un vector viral (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral).

En una realización particular de los métodos descritos en el presente documento, las células (*p. ej.*, linfocitos T humanos) se transducen con un virus (*p. ej.*, un retrovirus, por ejemplo un lentivirus) a una multiplicidad de infección (MOI) de 1.5 a 3.0.

En una realización específica, en el presente documento se proporciona un método de transducción de linfocitos T primarios (*p. ej.*, linfocitos T primarios humanos), que comprende: poner en contacto linfocitos T primarios con i) un vector viral (*p. ej.*, vector retroviral, por ejemplo, un vector lentiviral) que comprende un ácido nucleico y ii) un compuesto que es un inhibidor del sistema inmunológico innato, de modo que el ácido nucleico se transduce a los linfocitos T. En otra realización específica, dicha puesta en contacto de dichos linfocitos T primarios con dicho compuesto ocurre antes (*p. ej.*, 30 minutos antes, 1 hora antes, 2 horas antes, 3 horas antes, 4 horas antes, 6 horas antes, 7 horas antes, 8 horas antes, 9 horas antes o 10 horas antes) y/o concurrentemente con el contacto de dichos linfocitos T con dicho vector viral. En otra realización específica, dicho vector viral comprende un ácido nucleico que codifica una o más proteínas, por ejemplo, uno o más receptores de antígenos quiméricos (CAR).

En otra realización específica, dicho compuesto inhibe la actividad de la quinasa IKB ϵ (IKK ϵ) o la quinasa 1 de unión a TANK (TBK1). En otra realización específica, dicho compuesto que inhibe la actividad de la quinasa ϵ IKB (IKK ϵ) o la quinasa 1 de unión a TANK (TBK1) es BX795 (*p. ej.*, BX795 1 μM , 2 μM , 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM o 10 μM). En otra realización específica, dicho compuesto inhibe la actividad de la proteína quinasa R (PKR). En otra realización específica, dicho compuesto que inhibe la actividad de la proteína quinasa R (PKR) es 2-Aminopurina (2-AP) (*p. ej.*, 2-AP 1mM, 2mM, 2.5mM, 3mM, 4mM, 5mM, 6mM, 7mM, 8mM, 9mM o 10mM).

En otra realización específica, el método de transducción de linfocitos T primarios comprende además poner en contacto dichos linfocitos T primarios con un agente capaz de estimular un complejo receptor de linfocitos T antes de poner en contacto los linfocitos T primarios con el vector viral. En una realización específica, dicho agente es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, *p. ej.*, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 y/o CD28. En otra realización específica, el método de transducción de linfocitos T primarios comprende además poner en contacto los linfocitos T primarios con un reactivo de transformación (*p. ej.*, dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina) y, opcionalmente, una citoquina (*p. ej.*, interleucina 2 (IL-2), interleucina 7 (IL-7), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15) o interleucina 21 (IL-21)).

En otra realización específica, en el presente documento se proporciona un método de transducción de linfocitos T primarios (*p. ej.*, linfocitos T primarios humanos), que comprende: poner en contacto linfocitos T primarios humanos, en presencia de dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina e interleucina 2, con i) a vector retroviral, por ejemplo, un vector lentiviral que comprende un ácido nucleico que codifica una o más proteínas, por ejemplo, uno o más receptores de antígenos quiméricos, y ii) BX795 (*por ejemplo*, BX795 6 μM), de manera que el ácido nucleico se transduce en los linfocitos T. En una realización específica, dicha puesta en contacto de dichos linfocitos T primarios con BX795 ocurre antes (*p. ej.*, 3 horas antes, 6 horas antes) y/o concurrentemente con la puesta en contacto de dichos linfocitos T con dicho vector viral. En otra realización específica, dicho vector comprende un ácido nucleico que codifica uno o más receptores de antígenos quiméricos.

En otra realización específica, en el presente documento se proporciona un método de transducción de linfocitos T primarios (*p. ej.*, linfocitos T primarios humanos), que comprende: poner en contacto linfocitos T primarios humanos, en presencia de dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina e interleucina 2 (IL-2), con i) un vector retroviral, por ejemplo, un vector lentiviral que comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico y ii) BX795 6 μM , en donde el contacto de los linfocitos T primarios humanos con el BX795 6 μM se produce durante aproximadamente 3 horas, seguido de al menos 6 horas de poner en contacto simultáneamente los linfocitos T primarios humanos con el vector viral y el BX795 6 μM , de modo que el ácido nucleico se transduce en los linfocitos T. En otra realización específica, dicho vector viral comprende un ácido nucleico que codifica uno o más receptores de antígenos quiméricos.

En otra realización específica, en el presente documento se proporciona un método de transducción de linfocitos T primarios (*p. ej.*, linfocitos T primarios humanos), que comprende: poner en contacto linfocitos T primarios humanos, en presencia de dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina e interleucina 2, con i) a vector retroviral, por ejemplo, un vector lentiviral que comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico y ii) 2-AP (*p. ej.*, 2-AP 2.5-10 mM), de manera que el ácido nucleico se transduce en los linfocitos T. En una realización específica, dicho contacto de dichos linfocitos T primarios con 2-AP ocurre antes (*p. ej.*, 90 minutos antes, 2 horas antes o 3 horas antes) y/o concurrentemente con el contacto de dichos linfocitos T con dicho vector viral. En otra realización específica, dicho vector viral comprende un ácido nucleico que codifica uno o más receptores de antígenos quiméricos.

En otra realización específica, en el presente documento se proporciona un método de transducción de linfocitos T primarios (*p. ej.*, linfocitos T primarios humanos), que comprende: poner en contacto linfocitos T primarios humanos, en presencia de dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina e interleucina 2, con i) a vector retroviral, por ejemplo, un vector lentiviral que comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico y ii) 2-AP 2.5-10 mM, en donde la puesta en contacto de los linfocitos T primarios humanos con el 2-AP 2.5-10 mM se produce durante 90 minutos, seguido de al menos 5 horas de puesta en contacto concurrente de los linfocitos T primarios humanos con el vector viral y el 2-AP 2.5-10 mM, de forma que el ácido nucleico se transduce a los linfocitos T. En otra realización específica, dicho vector viral comprende un ácido nucleico que codifica uno o más receptores de antígenos quiméricos.

4. Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A y 1B muestran los efectos del tratamiento concurrente de DEAE-dextrano solo (Figura 1A) o con BX795 en presencia de DEAE-dextrano (Figura 1B, a concentraciones de 1 μM , 2 μM , 4 μM , 6 μM , 8 μM y 10 μM) sobre la eficiencia de la transducción de linfocitos T primarios usando lentivirus que codifican receptores de antígenos quiméricos.

La Figura 2 muestra los efectos del tratamiento con BX795 sobre la eficiencia de la transducción lentiviral. Se evaluó la eficiencia de transducción de linfocitos T primarios transducidos con lentivirus que codifican el receptor de antígeno quimérico para diversas condiciones: (i) pretratamiento con BX795, (ii) tratamiento concurrente con BX795, (iii) una combinación de pretratamiento con BX795 y tratamiento concurrente y (iv) un tratamiento de control.

Las Figuras 3A y 3B muestran los efectos de los reactivos de transformación DEAE-dextrano y sulfato de protamina sobre la viabilidad de los linfocitos T humanos primarios (Figura 3A) y los efectos de varias concentraciones de 2-AP en presencia de DEAE-dextrano o sulfato de protamina en la viabilidad de los linfocitos T humanos primarios transducidos con lentivirus (Figura 3B).

Las Figuras 4A y 4B muestran la eficiencia de la transducción lentiviral en ausencia de 2-AP (Figura 4A) o en presencia de concentraciones en aumento de 2-AP (Figura 4B a concentraciones de 2.5 mM, 5 mM o 10 mM).

5. Descripción detallada

5.1. Métodos de transducción

5.1.1. Células

Los ejemplos no limitantes de células que se pueden usar en los métodos descritos en el presente documento incluyen linfocitos T, células dendríticas (DC), células madre de la placenta (*p. ej.*, las células madre de la placenta descritas en las patentes de EE.UU. Nos. 7.468.276; 8.057.788 y 8.202.703) las células madre de tipo mesenquimal de sangre

del cordón umbilical, sangre de la placenta, sangre periférica, médula ósea, pulpa dentaria, tejido adiposo, tejido osteocondrial, y similares; células madre embrionarias, células germinales embrionarias, células madre de la cresta neural, células madre neurales y células diferenciadas (*p. ej.*, fibroblastos, etc.). Los métodos también pueden usarse en líneas de células tumorales, *p. ej.*, con fines experimentales en modelos animales. En una realización particular, las células de los métodos descritos en este documento pueden ser células primarias. Las células primarias son bien conocidas en la técnica y pueden incluir células extraídas de un sujeto (*p. ej.*, un ser humano) que se cultivan o expanden *in vitro* durante un período de tiempo que no conduce al inicio de la senescencia celular, y no se cultivan ni se expanden de una manera que conduzca a la inmortalización de las células. En una realización específica, las células utilizadas en los métodos descritos en este documento son linfocitos T humanos. En otra realización específica, las células utilizadas en los métodos descritos en el presente documento no son líneas celulares de linfocitos T.

En una realización específica, las células utilizadas en los métodos proporcionados en este documento son linfocitos T primarios (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios). Los linfocitos T primarios usados en los métodos proporcionados en este documento pueden ser linfocitos T nativos o linfocitos T restringidos por MHC. En determinadas realizaciones, los linfocitos T son CD4⁺. En otras realizaciones, los linfocitos T son CD8⁺. En determinadas realizaciones, los linfocitos T primarios son linfocitos que infiltran tumores (TIL). En determinadas realizaciones, los linfocitos T primarios se han aislado de una biopsia de tumor o se han expandido a partir de linfocitos T aislados de una biopsia de tumor. En determinadas realizaciones, los linfocitos T primarios se han aislado de, o se han expandido a partir de, linfocitos T aislados de sangre periférica, sangre de cordón o linfa. En determinadas realizaciones, los linfocitos T son alogénicos con respecto a un individuo particular, *p. ej.*, un receptor de dichos linfocitos T. En algunas otras realizaciones, los linfocitos T no son alogénicos con respecto a un determinado individuo, *p. ej.*, un receptor de dichos linfocitos T. En ciertas realizaciones, los linfocitos T son autólogos con respecto a un individuo particular, *p. ej.*, un receptor de dichos linfocitos T.

En una realización, los linfocitos T primarios se obtienen de un individuo, opcionalmente expandidos y luego transducidos, usando los métodos descritos en este documento, con un ácido nucleico que codifica uno o más receptores de antígenos quiméricos (CAR) y opcionalmente luego expandidos. Véase la sección 5.2. Los linfocitos T se pueden expandir, por ejemplo, mediante puesta en contacto con linfocitos T en cultivo con anticuerpos a CD3 y/o CD28, *p. ej.*, anticuerpos unidos a perlas, o a la superficie de una placa de cultivo celular; véase, *p. ej.*, las patentes de EE.UU. Nos. 5,948,893; 6,534,055; 6,352,694; 6,692,964; 6,887,466; y 6,905,681. En realizaciones específicas, los anticuerpos son anti-CD3 y/o anti-CD28, y los anticuerpos no se unen a una superficie sólida (*p. ej.*, los anticuerpos entran en contacto con los linfocitos T en disolución). En otras realizaciones específicas, el anticuerpo anti-CD3 o el anticuerpo anti-CD28 se unen a una superficie sólida (*p. ej.*, una perla, plástico de placa de cultivo de tejidos) y el otro anticuerpo no se une a una superficie sólida (*p. ej.*, está presente en solución).

En determinadas realizaciones, los linfocitos T primarios usados en los métodos descritos en este documento se aíslan de un tumor, *p. ej.*, son linfocitos que infiltran el tumor. En realizaciones particulares, tales linfocitos T son específicos para un antígeno específico de tumor (TSA) o antígeno asociado a tumor (TAA). Véase la Sección 5.2.2.

5.1.2. Reactivos de transformación

Como se usa en este documento, términos como "transducción", "transformación" y "transfección" se usan indistintamente, a menos que se indique lo contrario. Los métodos de transducción de células son bien conocidos en la técnica. Durante la transducción, se pueden añadir pequeñas moléculas y/o polímeros, por ejemplo, a cultivos celulares para facilitar la unión y/o absorción de las proteínas y/o ácidos nucleicos de interés. En particular, se pueden añadir pequeños compuestos polares a las condiciones de cultivo para facilitar la unión y transducción de virus y ácido(s) nucleico(s) en los mismos. Los reactivos de transformación ilustrativos incluyen, sin limitación, Lipofectamine®, FuGENE®, fosfato cálcico, dietilaminoetilcelulosa-dextrano (DEAE-dextrano o DD) y sulfato de protamina. En determinadas realizaciones de los métodos descritos en este documento, la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) se produce en presencia de DEAE-dextrano o sulfato de protamina. En realizaciones particulares de los métodos descritos en este documento, la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) se produce en presencia de DEAE-dextrano, *p. ej.*, DEAE-dextrano 10µg/ml o sulfato de protamina, *p. ej.*, sulfato de protamina 10µg/ml.

5.1.3. Condiciones de cultivo y activación de linfocitos T

Las células descritas en el presente documento se pueden mantener en condiciones de cultivo específicas para facilitar o mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción viral). En una realización particular, los linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) son activados por un antígeno o un fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a una molécula coestimuladora de linfocitos T (*p. ej.*, CD28, CD3 y/o CD45) antes o concurrentemente con la transducción. En otra realización, dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se acopla a un sustrato sólido (*p. ej.*, dynabeads®). En una realización particular, los linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) son estimulados por anti-CD3, anti-CD28, y/o anticuerpos anti-CD45, o fragmento(s) de unión a antígeno de los mismos, acoplados a Dynabeads® durante 24 horas antes de la transducción (*p. ej.*, transducción viral). En otra realización particular, dicho

anticuerpo o fragmento(s) de unión a antígeno (*p. ej.*, de anti-CD3, anti-CD28 y/o anticuerpos anti-CD45 o fragmento(s) de unión a antígeno de los mismos) no están presentes en un sustrato sólido, sino que forman complejos con otro compuesto o composición que permite la presentación del anticuerpo o fragmento(s) de unión a antígeno a la célula, *p. ej.*, el anticuerpo o fragmento(s) de unión a antígeno forman complejos con un polímero, hidrogel, albúmina, y/o una molécula hidrofóbica. En realizaciones particulares, tal molécula o moléculas que forman complejos con el anticuerpo o fragmento(s) de unión a antígeno del mismo no es un adyuvante. En otra realización, dicho contacto ocurre al menos 48 horas, al menos 44 horas, al menos 40 horas, al menos 36 horas, al menos 32 horas, al menos 28 horas, al menos 24 horas, al menos 20 horas, al menos 16 horas, al menos 12 horas, al menos 8 horas o al menos 4 horas antes de la transducción de dichas células con un vector viral (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral).

En otra realización más, dicho contacto ocurre al menos 48 horas a 40 horas, 44 horas a 36 horas, 40 horas a 32 horas, 36 horas a 28 horas, 32 horas a 24 horas, 28 horas a 20 horas, 24 horas a 16 horas, 20 horas a 12 horas, 16 horas a 8 horas, 12 horas a 4 horas o al menos 8 horas a 1 hora antes de la transducción de dichas células con un vector viral (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral).

En otra realización, se pueden añadir citocinas y/o factores de crecimiento que estimulan la activación y/o proliferación de linfocitos T antes de o concurrentemente con la transducción. En una realización particular, se añade interleucina 2 (IL-2), *p. ej.*, IL-2 50U/ml, a los cultivos de linfocitos T (*p. ej.*, cultivos primarios de linfocitos T humanos) antes de o concurrentemente con la transducción (*p. ej.*, transducción viral). En otra realización, se añade interleucina 7 (IL-7), *p. ej.*, IL-7 10ng/ml, a los cultivos de linfocitos T (*p. ej.*, cultivos primarios de linfocitos T humanos) antes de o concurrentemente con la transducción (*p. ej.*, transducción viral). En otra realización, se añade interleucina 12 (IL-12), *p. ej.*, IL-12 10ng/ml, a los cultivos de linfocitos T (*p. ej.*, cultivos de linfocitos T humanos primarios) antes de o concurrentemente con la transducción (*p. ej.*, transducción viral). En otra realización, se añade interleucina 15 (IL-15), *p. ej.*, IL-15 10ng/ml, a los cultivos de linfocitos T (*p. ej.*, cultivos primarios de linfocitos T humanos) antes de o concurrentemente con la transducción (*p. ej.*, transducción viral). En otra realización más, se añade interleucina 21 (IL-21), *p. ej.*, IL-21 25ng/ml, a los cultivos de linfocitos T (*p. ej.*, cultivos de linfocitos T humanos primarios) antes de o concurrentemente con la transducción (*p. ej.*, transducción viral).

5.1.4. Inhibidores de la inmunidad innata

El sistema inmunológico innato puede reprimir la expresión de genes de virus, incluidos los virus sintéticos. Es bien conocido en la técnica que el sistema inmunológico innato comprende proteínas (*p. ej.*, gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I), proteína quinasa R (PKR), quinasa ϵ IKB (IKK ϵ), quinasa 1 de unión a TANK (TBK1)) que puede ser desencadenada por ARN bicatenario y otras macromoléculas patógenas, y que puede medirse fácilmente la actividad inmunológica innata (*p. ej.*, niveles secretados de proteínas de interferón que incluyen, pero no se limitan a, interferón- α , interferón- β , interferón- δ , interferón- ζ , interferón- κ e interferón- τ). Por consiguiente, en una realización particular de los métodos descritos en este documento, las células cultivadas se ponen en contacto con un inhibidor de la inmunidad innata. En otra realización, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) mediante la adición de compuestos, por ejemplo moléculas pequeñas, que inhiben la señalización inmune innata (*p. ej.*, BX795, Piceatannol, Gefitinib, Z-VAD-FMK, Glybenclamida, Pepinh-MyD, OxPAPC, CLI-095, Polimixina B, H-89, 2-Aminopurina (2-AP), Cloroquina, Bafilomicina A1 o similares).

En determinadas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) poniendo en contacto los linfocitos T con un inhibidor de la respuesta inmunológica innata antes de, concurrentemente con o después de la transducción. En una realización específica de los métodos descritos en el presente documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) tras el tratamiento con un inhibidor de la quinasa ϵ IKB (IKK ϵ) y/o quinasa 1 de unión a TANK (TBK1) antes de, concurrentemente con o después de la transducción. En otra realización específica de los métodos descritos en este documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) con el tratamiento con BX795 antes de, concurrentemente con o después de la transducción de células.

En una realización específica de los métodos descritos en este documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) tras tratamiento con BX795 a una concentración de 0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M, 12 μ M, 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 16 μ M, 17 μ M, 18 μ M, 19 μ M, 20 μ M, o mayor. En otra realización específica de los métodos descritos en este documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) tras tratamiento con BX795 a una concentración de 0.5 μ M a 1 μ M, 1 μ M a 3 μ M, 2 μ M a 4 μ M, 3 μ M a 5 μ M, 4 μ M a 6 μ M, 5 μ M a 7 μ M, 6 μ M a 8 μ M, 7 μ M a 9 μ M, 8 μ M a 10 μ M, 9 μ M a 11 μ M, 10 μ M a 12 μ M, 11 μ M a 13 μ M, 12 μ M a 14 μ M o 13 μ M a 15 μ M, 10 μ M a 20 μ M, 10 μ M a 15 μ M o 10 μ M a 12 μ M.

En determinadas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) tras tratamiento con BX795 antes de la transducción de las células. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por

ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) tras tratamiento con BX795 durante más de 5 horas antes de la transducción, 5 horas antes de la transducción, 4 horas antes de la transducción, 3 horas antes de la transducción, 2 horas antes de la transducción, 1 hora antes de la transducción, 30 minutos antes de la transducción, 15 minutos antes de la transducción, 5 minutos antes de la transducción o concurrentemente con la transducción. En una realización específica de los métodos descritos en el presente documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) con el tratamiento con BX795 de 4 a 5 horas antes de la transformación, 3 a 4 horas antes de la transducción, 2 a 3 horas antes de la transducción, 1 a 2 horas antes de la transducción, 30 minutos a 1 hora antes de la transducción o concurrentemente a 30 minutos antes de la transducción. En una realización específica de los métodos descritos en el presente documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) tras el tratamiento con BX795 tanto antes como concurrentemente con la transducción en cualquiera de los puntos temporales descritos en este documento.

En una realización específica, dicho inhibidor del sistema inmunológico innato es un inhibidor de la proteína quinasa R (PKR). En una realización específica de los métodos descritos en el presente documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) tras el tratamiento con un inhibidor de la proteína quinasa R (PKR) bien antes, concurrentemente con o después de la transducción. En una realización específica, dicho compuesto es 2-Aminopurina (2-AP).

En determinadas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) tras tratamiento de linfocitos T con un inhibidor de la respuesta inmunitaria innata antes, concurrentemente o después de la transducción. En una realización específica de los métodos descritos en el presente documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) tras el tratamiento con un inhibidor de la proteína quinasa R (PKR) bien antes, concurrentemente con o después de la transducción. En otra realización específica de los métodos descritos en el presente documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) tras tratamiento con 2-AP antes de, concurrentemente con o después de la transducción. de las células.

En una realización específica de los métodos descritos en el presente documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) tras tratamiento con 2-AP a una concentración de 0.5mM, 1mM, 2mM, 3mM, 4mM, 5mM, 6mM, 7mM, 8mM, 9mM, 10mM, 11mM, 12mM, 13mM, 14mM, 15mM o mayor. En otra realización específica de los métodos descritos en este documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) tras tratamiento con 2-AP a una concentración de 0.5mM a 1mM, 1mM a 3mM, 2mM a 4mM, 3mM a 5mM, 4mM a 6mM, 5mM a 7mM, 6mM a 8mM, 7mM a 9mM, 8mM a 10mM, 9mM a 11mM, 10mM a 12mM, 11mM a 13mM, 12mM a 14mM o 13mM a 15mM.

En determinadas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, Linfocitos T humanos primarios) tras el tratamiento con 2-AP antes de la transducción de las células. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) tras tratamiento con 2-AP durante más de 5 horas antes de la transducción, 5 horas antes de la transducción, 4 horas antes de la transducción, 3 horas antes de la transducción, 2 horas antes de la transducción, 1 hora antes de la transducción, 30 minutos antes de la transducción, 15 minutos antes de la transducción, 5 minutos antes de la transducción o concurrentemente con la transducción. En una realización específica de los métodos descritos en el presente documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) tras tratamiento con 2-AP 4 a 5 horas antes de la transducción, 3 a 4 horas antes de la transducción, 2 a 3 horas antes de la transducción, 1 a 2 horas antes de la transducción, 30 minutos a 1 hora antes de la transducción o concurrentemente a 30 minutos antes de la transducción. En una realización específica de los métodos descritos en el presente documento, se puede mejorar la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) tras tratamiento con 2-AP tanto antes como concurrentemente con la transducción en cualquier momento de los puntos temporales descritos en este documento.

5.1.5. Transducción viral

En una realización de los métodos descritos en el presente documento, puede producirse la transducción (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo, transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) usando virus a diversas multiplicidades de infección (MOI). En una realización específica de los métodos descritos en este documento, la transducción se produce (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) a una multiplicidad viral de infección (MOI) de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3.0 o mayor. Una realización específica de los métodos descritos en este documento, la transducción se produce (*p. ej.*, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos

T (*p. ej.*, linfocitos humanos primarios) a una multiplicidad viral de infección (MOI) de 0.1 a 0.3, 0.2 a 0.4, 0.4 a 0.6, 0.6 a 0.8, 0.8 a 1.0, 1.0 a 1.2, 1.2 a 1.4, 1.4 a 1.6, 1.6 a 1.8, 1.8 a 2.0, 2.0 a 2.2, 2.2 a 2.4, 2.4 a 2.6, 2.6 a 2.8 o 2.8 a 3.0.

En una realización específica de los métodos descritos en el presente documento, poner en contacto linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) con un compuesto (*p. ej.*, BX795 o 2-AP) para aumentar la eficiencia de transducción (*p. ej.*, eficiencia de transducción lentiviral) mejora la transducción de secuencias de ácido nucleico aisladas (*p. ej.*, vectores que codifican receptores de antígenos quiméricos). Por ejemplo, secuencias de ácido nucleico de 9 kilobases (kb) de longitud, 10 kb de longitud, 11 kb de longitud, 12 kb de longitud, 13 kb de longitud, 14 kb de longitud, 15 kb de longitud, 16 kb de longitud, 17 kb de longitud o 18 kb de longitud o más se pueden transducir a células con mayor eficiencia como resultado de los métodos descritos en este documento (*es decir*, en comparación con la eficiencia de transducción en ausencia de un compuesto descrito (*p. ej.*, BX795 o 2-AP)). En determinadas realizaciones, los métodos descritos en este documento dan como resultado una transducción mejorada de moléculas de ácido nucleico (*p. ej.*, vectores, por ejemplo, vectores virales tales como retrovirales, *p. ej.*, lentivirales, vectores, incluidos vectores que codifican una o más proteínas, *p. ej.*, uno o más receptores de antígenos quiméricos), en donde dichas moléculas de ácido nucleico tienen 9 kilobases (kb) de longitud a 10 kb de longitud, 10 kb de longitud a 11 kb de longitud, 11 kb de longitud a 12 kb de longitud, 12 kb de longitud a 13 kb de longitud, 13 kb de longitud a 14 kb de longitud, 14 kb de longitud a 15 kb de longitud, 15 kb de longitud a 16 kb de longitud, 16 kb de longitud a 17 kb de longitud, 17 kb de longitud a 18 kb de longitud, o de 9 a 18 kb de longitud o de 10 a 15 kb de longitud.

En un aspecto particular de los métodos descritos en este documento, los linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) se pueden transducir (*p. ej.*, transducir un retrovirus, por ejemplo, un lentivirus) con dos o más ácidos nucleicos aislados diferentes, *p. ej.*, dos, tres, cuatro o cinco ácidos nucleicos de secuencia no idéntica. En una realización específica, poner en contacto los linfocitos T (*p. ej.*, linfocitos T humanos primarios) con un compuesto para aumentar la eficiencia de transducción (*p. ej.*, eficiencia de transducción retroviral, por ejemplo, eficiencia de transducción lentiviral) mejora la transducción de uno, dos, tres, cuatro o cinco ácidos nucleicos aislados diferentes (*p. ej.*, vectores, por ejemplo, vectores virales, tales como retrovirales, *p. ej.*, vectores lentivirales, que incluyen vectores que codifican una o más proteínas, por ejemplo, codifican uno o más receptores de antígenos quiméricos).

En una realización específica de los métodos descritos en este documento, los linfocitos T humanos primarios se estimulan durante 24 horas con anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28, o fragmento(s) de unión al antígeno de los mismos, en presencia de IL-2 50U/ml y DEAE-Dextrano 10 µg/ml, seguido de tratamiento de dichos linfocitos con BX795 durante 3 horas, seguido de transducción lentiviral de dichos linfocitos, en donde el virus está a una multiplicidad de infección (MOI) de 1.8 y en donde los linfocitos T humanos se tratan con BX795 6 µM concurrentemente con la adición del lentivirus durante otro período de 6 horas.

En una realización específica de los métodos descritos en este documento, los linfocitos T humanos primarios se estimulan durante 24 horas con anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28, o fragmento(s) de unión al antígeno de los mismos, en presencia de IL-2 50U/ml y DEAE-Dextrano 10 µg/ml, seguido de tratamiento de dichos linfocitos con 2-AP durante 5 horas, seguido de transducción lentiviral de dichos linfocitos, en donde el virus está a una multiplicidad de infección (MOI) de 1.8 y en donde los linfocitos T humanos se tratan con 2-AP 2.5-10 mM concurrentemente con la adición del lentivirus durante otro período de 5 horas.

En una realización específica de los métodos descritos en este documento, los linfocitos T humanos primarios se estimulan durante 24 horas con anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28, o fragmento(s) de unión al antígeno de los mismos, en presencia de IL-2 50U/ml y 10µg/ml de sulfato de protamina, seguido de tratamiento de dichos linfocitos con BX795 durante 6 horas, seguido de transducción lentiviral de dichos linfocitos, en donde el virus está a una multiplicidad de infección (MOI) de 1.8 y en donde los linfocitos T humanos se tratan con BX795 6 µM concurrentemente con la adición del lentivirus durante otro período de 6 horas.

En una realización específica de los métodos descritos en este documento, los linfocitos T humanos primarios se estimulan durante 24 horas con anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28, o fragmento(s) de unión al antígeno de los mismos, en presencia de IL-2 50U/ml y 10µg/ml de sulfato de protamina, seguido de tratamiento de dichos linfocitos con 2-AP durante 5 horas, seguido de transducción lentiviral de dicho linfocitos, en donde el virus está a una multiplicidad de infección (MOI) de 1.8 y en donde los linfocitos T humanos se tratan con 2-AP 2.5-10 mM concurrentemente con la adición del lentivirus durante otro período de 5 horas.

5.2. Receptores de Antígenos Quiméricos

En determinadas realizaciones, los métodos proporcionados en este documento se utilizan para transducir un ácido nucleico que codifica uno o más receptores de antígenos quiméricos (CAR) en una célula, *p. ej.*, un linfocito T (*p. ej.*, un linfocito T primario). Los CAR son proteínas artificiales unidas a la membrana que dirigen un linfocito T hacia un antígeno y estimulan al linfocito T para que mate las células que exhiben el antígeno. Véase, *p. ej.*, Eshhar, patente de EE.UU. No. 7,741,465. Generalmente, los CAR comprenden un dominio extracelular que se une a un antígeno, *p. ej.*, un antígeno en una célula, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular (citoplásmico) que transmite una señal de activación primaria a una célula inmunitaria. Habiéndose cumplido todas las demás condiciones, cuando se expresa un CAR en la superficie de, *p. ej.*, 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 activarlo y/o proliferar.

y, si el antígeno está presente en una superficie de la célula, matar la célula que expresa el antígeno. Debido a que los linfocitos T requieren dos señales, una señal de activación primaria y una señal coestimuladora, para activarse al máximo, los CAR pueden comprender un dominio estimulador y coestimulador de tal manera que la unión del antígeno al dominio extracelular da como resultado la transmisión de una señal de activación primaria y una señal coestimuladora.

5.2.1. Dominio Intracelular de la Estructura de CAR General

[0043] En determinadas realizaciones, 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 la proliferación de dichos linfocitos T. Tal dominio o motivo es capaz de transmitir una señal primaria de unión al antígeno que es necesaria para la activación de un linfocito T en respuesta a la unión del antígeno a la porción extracelular del CAR. Normalmente, este dominio o motivo comprende, o es, un ITAM (motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina). Los polipéptidos que contienen ITAM adecuados para los CAR incluyen, por ejemplo, la cadena zeta CD3 (CD3ζ) o porciones de la misma que contienen ITAM. En una realización específica, el dominio intracelular es un dominio de señalización intracelular CD3ζ. En otras realizaciones específicas, el dominio intracelular es de una cadena de receptor de linfocitos, una proteína compleja TCR/CD3, una subunidad del receptor de Fc o una subunidad del receptor de IL-2.

En determinadas realizaciones, el CAR comprende adicionalmente uno o más dominios o motivos coestimuladores, *p. ej.*, como parte del dominio intracelular del polipéptido. El uno o más dominios o motivos coestimuladores pueden, por ejemplo, ser o comprender, uno o más de una secuencia de polipéptido de CD27 coestimulador, una secuencia de polipéptido de CD28 coestimulador, una secuencia de polipéptido de OX40 (CD134) coestimulador, una secuencia de polipéptido 4-1BB coestimulador (CD137), o una secuencia de polipéptido (ICOS) coestimulador de células T inducibles coestimuladoras u otro dominio o motivo coestimulador, o cualquier combinación de los mismos.

La región transmembrana puede ser cualquier región transmembrana que se pueda incorporar en un CAR funcional, *p. ej.*, una región transmembrana de una molécula CD4 o CD8.

En determinadas realizaciones, el dominio intracelular se puede modificar adicionalmente para codificar una proteína detectable, por ejemplo, fluorescente (*p. ej.*, proteína verde fluorescente) o cualquier variante conocida de la misma.

5.2.2. Dominio Extracelular CAR

En determinadas realizaciones, el ácido nucleico transducido en células usando los métodos descritos en este documento comprende una secuencia que codifica un polipéptido, en donde el dominio extracelular del polipéptido se une a un antígeno de interés. En determinadas realizaciones, el dominio extracelular comprende un receptor, o una porción de un receptor, que se une a dicho antígeno. En determinadas realizaciones, el dominio extracelular comprende, o es, un anticuerpo o una porción que se une al antígeno del mismo. En realizaciones específicas, el dominio extracelular comprende, o es, un dominio Fv monocatenario. El dominio Fv monocatenario puede comprender, por ejemplo, un VL unido a VH mediante un enlazador flexible, en donde dichos VL y VH son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno.

El antígeno al que se une el dominio extracelular del polipéptido puede ser cualquier antígeno de interés, *p. ej.*, puede ser un antígeno en una célula tumoral. La célula tumoral puede ser, *p. ej.*, una célula en un tumor sólido o una célula de un cáncer de sangre. El antígeno puede ser cualquier antígeno que se exprese en una célula de cualquier tumor o tipo de cáncer, *p. ej.*, células de un linfoma, un cáncer de pulmón, un cáncer de mama, un cáncer de próstata, un carcinoma adrenocortical, un carcinoma de tiroides, un carcinoma nasofaríngeo, un melanoma, *p. ej.*, un melanoma maligno, un carcinoma de piel, un carcinoma colorrectal, un tumor desmoide, un tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, un tumor endocrino, un sarcoma de Ewing, un tumor neuroectodérmico primitivo periférico, un tumor de células germinales sólidas, un hepatoblastoma, un neuroblastoma, un sarcoma de tejido blando no rabdomiosarcoma, un osteosarcoma, un retinoblastoma, un rabdomiosarcoma, un tumor de Wilms, un glioblastoma, un mixoma, un fibroma, un lipoma o similares. En realizaciones más específicas, dicho linfoma puede ser leucemia linfocítica crónica (linfoma linfocítico pequeño), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocítico, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de zona marginal esplénica, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma, linfoma de células B de zona marginal extranodal, linfoma MALT, linfoma nodal de células B de zona marginal, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de efusión primaria, linfoma de Burkitt, leucemia prolinfocítica de linfocitos T, leucemia linfocítica granular grande de linfocitos T, leucemia agresiva de células NK, leucemia/linfoma de linfocitos T adultos, linfoma de linfocitos NK/T extranodal, tipo nasal, linfoma de linfocitos T de tipo enteropatía, linfoma de linfocitos T hepatoesplénico, linfoma de células NK blásticas, micosis fungoide, síndrome de Sezary, linfoma anaplásico cutáneo primario de células grandes, papulosis linfomatoide, linfoma de linfocitos T angioinmunoblástica, linfoma de linfocitos T periférico (sin especificar), linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de Hodgkin o linfoma no Hodgkin. En una realización específica, en la que el cáncer es leucemia linfocítica crónica (CLL), las células B de la CLL tienen un cariotipo normal. En otras realizaciones específicas, en las que el cáncer es leucemia linfocítica crónica (CLL), las células B de la CLL llevan una delección 17p, una delección 11q, una trisomía 12q, una delección 13q o una delección p53.

En determinadas realizaciones, el antígeno es un antígeno asociado a tumor (TAA) o un antígeno específico de tumor (TSA). En diversas realizaciones específicas, sin limitación, el antígeno asociado al tumor o el antígeno específico del tumor es el antígeno de maduración de células B (BCMA), el factor de activación de células B (BAFF), Her2, el antígeno de células madre prostáticas (PSCA), el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) alfa-fetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), EGFRvIII, antígeno del cáncer-125 (CA-125), CA19-9, calretinina, MUC-1, proteína de la membrana epitelial (EMA), antígeno tumoral epitelial (ETA), tirosinasa, antígeno asociado a melanoma (MAGE), CD19, CD20, CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del fluido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, proteína melan-A (antígeno de melanoma reconocido por los linfocitos T; MART-1), myo-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisis, tiroglobulina, factor -1 de transcripción tiroideo, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), la forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (tumor M2-PK), una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal.

En determinadas realizaciones, el TAA o TSA es un antígeno de cáncer/testis (CT), *p. ej.*, BAGE, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-ESO-1, NY-SAR-35, OY-TES-1, SPANXB1, SPA17, SSX, SYCP1 o TPTE.

En determinadas realizaciones, el TAA o TSA es un hidrato de carbono o gangliósido, *p. ej.*, fuc-GM1, GM2 (antígeno oncofetal-inmunogénico-1; OFA-I-1); GD2 (OFA-I-2), GM3, GD3 y similares.

En determinadas realizaciones, el TAA o TSA es alfa-actinina-4, Bage-1, BCR-ABL, proteína de fusión Bcr-Abl, beta-catenina, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29/BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, Casp-8, cdc27, cdk4, cdkn2a, CEA, coa-1, proteína de fusión dek-can, EBNA, EF2, antígenos del virus de Epstein Barr, proteína de fusión ETV6-AML1, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-1, 2, y 3, neo-PAP, clase I de miosina, OS-9, proteína de fusión pml-RAR α , PTPRK, K-ras, N-ras, isomerasa trifosfato, Gage 3,4,5,6,7, GnTV, Herv-K-mel, Lage-1, NA-88, NY-ESO-1/Lage-2, SP17, SSX-2, TRP2-Int2, gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, RAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15(58), RAGE, SCP-1, Hom/Mel-40, PRAME, p53, H-Ras, HER-2/neu, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos E6 y E7 del papilomavirus humano (HPV), TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, 13-Catenina, Mum-1, p16, TAGE, PSMA, CT7, telomerasa, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68/KP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB\70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TAG72, TLP, TPS, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico) proteína 17 del esperma (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína del marco de lectura alterna gamma del receptor de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial transmembrana seis de la próstata 1), una proteína anormal ras, o una proteína p53 anormal. En otra realización específica, dicho antígeno asociado a tumor o antígeno específico de tumor es integrina $\alpha\beta$ 3 (CD61), galactina, K-Ras (oncogén viral de sarcoma de rata de Kirsten V-Ki-ras2) o Ral-B. Los expertos en la técnica conocen otros antígenos asociados a tumores y específicos de tumores.

Los anticuerpos y scFv que se unen a TSA y TAA incluyen anticuerpos y scFV que se conocen en la técnica, al igual que las secuencias de nucleótidos que los codifican.

En determinadas realizaciones específicas, el antígeno es un antígeno que no se considera un TSA o un TAA, pero que, no obstante, está asociado con células tumorales o daño causado por un tumor. En determinadas realizaciones, por ejemplo, el antígeno es, *p. ej.*, un factor de crecimiento, citoquina o interleucina, *p. ej.*, un factor de crecimiento, citoquina o interleucina asociada con angiogénesis o vasculogénesis. Dichos factores de crecimiento, citocinas o interleucinas pueden incluir, por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de tipo insulina (IGF) o interleucina-8 (IL-8). Los tumores también pueden crear un ambiente hipóxico local al tumor. Como tal, en otras realizaciones específicas, el antígeno es un factor asociado a hipoxia, *p. ej.*, HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α o HIF-3 β . Los tumores también pueden causar daño localizado al tejido normal, provocando la liberación de moléculas conocidas como moléculas de patrón molecular asociadas al daño (DAMP, también conocidas como alarminas). En algunas otras realizaciones específicas, por lo tanto, el antígeno es un DAMP, *p. ej.*, una proteína de choque térmico, una proteína asociada a la cromatina, cuadro 1 de grupo de alta movilidad (HMGB1), S100A8 (MRP8, calgranulina A), S100A9 (MRP14, calgranulina B), amiloide A sérico (SAA), o puede ser un ácido desoxirribonucleico, trifosfato de adenosina, ácido úrico o sulfato de heparina.

En determinadas realizaciones de los polipéptidos descritos en este documento, el dominio extracelular se une a dicho dominio transmembrana directamente o mediante una secuencia polipeptídica enlazadora, espaciadora o bisagra, *p. ej.*, una secuencia de CD28 o una secuencia de CTLA4.

5.3. Ácidos Nucleicos Aislados

Un experto en la técnica apreciará que los métodos descritos en este documento no se limitan a la transducción de ningún tipo particular de vector y que los vectores transducidos no se limitan con respecto al tipo particular de ácido nucleico que comprenden. Por consiguiente, debería entenderse que los vectores que comprenden ácidos nucleicos

usados para transducir células de acuerdo con los métodos descritos en este documento pueden comprender, por ejemplo, cualquier ácido nucleico que codifique cualquier proteína o polipéptido de interés (*p. ej.*, CAR).

En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden estar contenidos dentro de cualquier vector polinucleotídico adecuado para la transducción de células inmunes, *p. ej.*, linfocitos T. Por ejemplo, los linfocitos T se pueden transformar o transducir usando vectores sintéticos, vectores retrovirales (*p. ej.*, vectores lentivirales), plásmidos de replicación autónoma, un virus (*p. ej.*, un retrovirus, lentivirus, adenovirus o virus herpes), o similares, que contienen polinucleótidos que codifican polipéptidos de interés (*p. ej.*, receptores quiméricos).

En una realización específica, los vectores retrovirales, por ejemplo los vectores lentivirales, se usan de acuerdo con los métodos descritos en este documento. Los vectores retrovirales, por ejemplo vectores lentivirales, adecuados para la transformación o transducción de linfocitos T incluyen, pero no se limitan a, *p. ej.*, los vectores antivirales descritos en las patentes de EE.UU. Nos. 5,994,136; 6,165,782; 6,428,953; 7,083,981; y 7,250,299.

En otra realización específica, los vectores de VIH se utilizan de acuerdo con los métodos descritos en este documento. Los vectores de HIV adecuados para la transducción de linfocitos T incluyen, pero no se limitan a, *p. ej.*, los vectores descritos en la patente de EE.UU. No. 5,665,577.

Los ácidos nucleicos útiles en la producción de polipéptidos, *p. ej.*, dentro de un linfocito T, incluyen ADN, ARN o análogos de ácidos nucleicos. Los análogos de ácidos nucleicos se pueden modificar en el resto de base, resto de azúcar o cadena principal de fosfato, y pueden incluir la sustitución de desoxiuridina por desoxitimidina, 5-metil-2'-desoxicitidina o la sustitución de 5-bromo-2'-desoxicitidina por desoxicitidina. Las modificaciones del resto de azúcar pueden incluir la modificación del hidroxilo 2' del azúcar ribosa para formar azúcares 2'-O-metilo o 2'-O-alilo. La cadena principal de la desoxirribosa fosfato se puede modificar para producir ácidos morfolino nucleicos, en los que cada resto de base está unido a un anillo morfolino de seis miembros o ácidos nucleicos peptídicos, en los que el esqueleto de desoxifosfato se reemplaza por un esqueleto pseudopeptídico y se retienen las cuatro bases. Véase, por ejemplo, Summerton and Weller (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:187-195; y Hyrup et al. (1996) *Bioorgan. Med. Chain.* 4:5-23. Además, la cadena principal del desoxifosfato se puede reemplazar, por ejemplo, con una cadena principal de fosforotioato o fosforoditioato, una fosforamidita o una cadena principal de alquilfosfotriéster.

6. Ejemplos

6.1 Ejemplo 1: Transducción Primaria de Linfocitos T con Exposición Concurrente a BX795

6.1.1. Tratamiento Concurrente de Linfocitos T Humanos Primarios con DEAE-Dextrano Facilita la Transducción Lentiviral

Se cultivaron linfocitos T humanos primarios en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v), y activado con Dynabeads® anti-CD3/CD28 en una proporción Dynabead:linfocitos T de 3:1. Después de 24 horas de activación, se añadió IL-2 50U/ml al medio de cultivo con o sin DEAE-Dextrano (DD). Se añadió lentivirus que codifica el vector JL28.2 (VEGFR2-CD28TM-CD28IC-P2A-GFP), que codifica un receptor de antígeno quimérico compuesto de proteína VEGFR2 y GFP, al cultivo de linfocitos T activados a una multiplicidad de infección (MOI) de 1.8. Se usó la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para determinar la proporción de linfocitos T que expresan VEGFR2 como marcador para células transducidas con éxito. Como se muestra en la Figura 1A, el 2.61% de las células tratadas con un blanco (es decir, células que no recibieron virus) eran VEGFR2⁺, el 3.99% de las células incubadas con lentivirus pero sin DD eran VEGFR2⁺, mientras que el 9.80% de las células incubadas con lentivirus y DD eran VEGFR2⁺. Por tanto, se determinó que el tratamiento de linfocitos T humanos primarios con DEAE-dextrano facilita la transducción lentiviral.

6.1.2. Tratamiento Concomitante con BX795 Mejora la Eficiencia de la Transducción de Linfocitos T Humanos Primarios

Se cultivaron y activaron linfocitos T humanos primarios como en la Sección 6.1.1 y se transdujeron con el vector JL28.2 en presencia de DEAE-Dextrano (DD) y un rango de concentraciones de BX795, que se añadió concurrentemente con el lentivirus y se dejó incubar durante seis horas. A continuación, se analizaron los linfocitos transducidos mediante FACS para determinar la proporción de células transducidas con éxito. Como se muestra en la figura 1B, hubo un aumento en la eficiencia de la transducción viral que se correlacionaba con la concentración aumentada de BX795 (el 7.63% de las células transducidas eran VEGFR2⁺ cuando se trataba con BX795 1µM y el 10.5% de células transducidas era VEGFR2⁺ cuando se trataba con BX795 10µM). Por tanto, se determinó que el tratamiento concurrente de linfocitos T con lentivirus y BX795 a dosis altas (10 µM) da como resultado una mayor eficiencia de transducción de las células por vectores lentivirales.

6.2. Ejemplo 2: Se Requiere Pretratamiento con BX795 para Aumentar la Eficiencia de la Transducción de Linfocitos T Humanos Primarios

Se cultivaron y activaron linfocitos T humanos primarios como se describe en el Ejemplo 1, pero con una población celular que se trató con DD solo ("Control solo DD"), siendo tratada una población celular con BX795 6 µM añadido concurrentemente con la transducción lentiviral durante un período de seis horas ("Concurrente"), siendo tratada una

población de células con BX795 6 μ M durante tres horas antes de la transducción lentiviral ("Pretratada") y siendo tratadas una población de células con BX795 6 μ M tanto antes como concurrentemente con la transducción lentiviral durante un periodo de tiempo total de nueve horas ("Pretratada+Concurrente").

Los linfocitos T se cultivaron durante ocho días después de la transducción y se controló la expresión de VEGFR2 los días 3 y 8 después de la transducción. Como se muestra en la Figura 2, BX795 añadido a cultivos de linfocitos T concurrentemente con el lentivirus no mostró ninguna mejora en la expresión de VEGFR2 ni en el día 3 ni en el día 8 en comparación con los cultivos de control solo DD. El pretratamiento de linfocitos T con BX795 condujo a un aumento en la expresión de VEGFR2 tanto en el día 3 como en el día 8 en comparación con los cultivos de control solo DD. Los cultivos de linfocitos T tratados con BX795 ambos antes y durante la transducción lentiviral expresaban VEGFR2 a un nivel aproximadamente dos veces tal alto como en los cultivos solo DD y mayor que los otros dos linfocitos tratados con BX795 (el 9.80% de las células eran VEGFR2⁺ en el Control Solo DD el día 3 en comparación al 18.4% de células VEGFR2⁺ en el grupo Pretratado+Concurrente el día 3; y el 4.95% de las células era VEGFR2⁺ en el Control Solo DD el día 8 en comparación con el 10.6% de células VEGFR2⁺ en el grupo Pretratado+Concurrente).

6.3. Ejemplo 3: Tratamiento de Linfocitos T Humanos Primarios con 2-Aminopurina 6.3.1. La 2-Aminopurina no altera la viabilidad celular

Se cultivaron linfocitos T humanos primarios en medio RPMI-1640 complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (v/v) y activado con Dynabeads® anti-CD3/CD28 en una proporción Dynabead: linfocitos de 3:1 durante 24 horas. Se añadió 2-Aminopurina (2-AP) a los cultivos y se incubaron durante 90 minutos a 37°C. Se añadió DEAE-dextrano (DD) o sulfato de protamina (PS) a los cultivos en presencia de IL-2 50U/ml y vector lentiviral JL28.2 a una MOI de 3. Se analizó la viabilidad de las células mediante FACS.

En ausencia de 2-AP, el 84% de las células tratadas sin DD o PS eran viables después de transducción lentiviral, mientras que el 73.6% de las células eran viables cuando se transducían en presencia de DD, y el 84.9% de las células eran viables cuando se transducían en presencia de PS. (Figura 3A) Cuando los linfocitos T primarios se cultivaron como anteriormente con la adición de 2-AP a 2.5mM, 5mM o 10mM, la viabilidad no se redujo en comparación con las células cultivadas en ausencia de 2-AP (Figura 3B), indicando que 2-AP no altera la viabilidad de los linfocitos T humanos primarios activados en cultivo.

6.3.2. El Tratamiento con 2-Aminopurina Mejora la Eficiencia de la Transducción Lentiviral de los Linfocitos T Humanos Primarios

Se cultivaron linfocitos T humanos primarios como en la Sección 6.3.1 y se analizaron mediante FACS para determinar la expresión de VEGFR2. Como se muestra en la Figura 4A, el 4.49% de las células transducidas con lentivirus en ausencia de DD o PS eran positivas para VEGFR2, mientras que el 1.25% de las células tratadas solo con DD era VEGFR2⁺ y el 0.565% de las células tratadas con PS solo era VEGFR2⁺.

En presencia de DD o PS, la transducción lentiviral mejoró cuando los linfocitos T primarios se pretrataron con 2-AP durante 90 minutos y se mantuvieron en cultivo con lentivirus y diversas concentraciones de 2-AP durante 5 horas (Figura 4B). Todas las concentraciones de 2-AP (*es decir*, 2.5 mM, 5 mM o 10 mM) aumentaron la eficiencia de la transducción en comparación con las células no expuestas a 2-AP (Control). Estos resultados indican que el tratamiento con 2-AP aumenta la eficacia de transducción de linfocitos T humanos primarios en presencia de DEAE-dextrano o sulfato de protamina.

Equivalentes

La presente divulgación no está limitada en alcance por las realizaciones específicas descritas en este documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención proporcionadas en este documento, además de aquellas descritas, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción que antecede. Dichas modificaciones están destinadas a caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de transducción de un linfocito T primario, que comprende:

- (i) poner en contacto un linfocito T primario con un compuesto que es BX795 o 2-Aminopurina;
- (ii) poner en contacto dicho linfocito T primario con un vector lentiviral o vector retroviral que comprende un ácido nucleico,

en donde dicha puesta en contacto de dicho linfocito T primario con dicho compuesto se produce antes de la puesta en contacto de dicho linfocito T primario con dicho vector lentiviral o vector retroviral; y

en donde dicho método comprende además poner en contacto dicho linfocito T primario con un agente capaz de estimular un complejo receptor de células T antes de poner en contacto dicho linfocito T primario con dicho vector lentiviral o vector retroviral;

en donde dicho agente es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 y/o CD28; y

mediante el cual el ácido nucleico se transduce al linfocito T.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho linfocito T primario es un linfocito T primario humano.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha puesta en contacto de dicho linfocito T primario con dicho compuesto se produce tres horas antes de dicha puesta en contacto de dicho linfocito T primario con dicho vector lentiviral o vector retroviral.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho vector lentiviral o vector retroviral se pone en contacto con dicho linfocito T primario a una multiplicidad de infección (MOI) de 1.5 a 2.5.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho ácido nucleico:

- (i) tiene una longitud superior a 10 kilobases (kb);
- (ii) tiene una longitud de aproximadamente 9 a 20 kb; y/o
- (iii) codifica un receptor de antígeno quimérico.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho BX795 está a una concentración de 4-8 μ M.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha 2-Aminopurina está a una concentración de 2.5-10 mM.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho agente se pone en contacto con dicho linfocito T primario durante 24 horas antes de poner en contacto dicho linfocito T primario con dicho vector lentiviral o vector retroviral.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además poner en contacto dicho linfocito T primario con dicho compuesto concurrentemente con y/o después de dicha puesta en contacto con dicho vector lentiviral o vector retroviral.

10. El método de la reivindicación 9, que comprende poner en contacto dicho linfocito T primario con dicho vector lentiviral o vector retroviral y dicho compuesto concurrentemente durante al menos seis horas.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además poner en contacto dicho linfocito T primario con un reactivo de transformación y una citocina.

12. El método de la reivindicación 11, en donde:

- (i) dicho reactivo de transformación es dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina, y/o
- (ii) dicha citocina es interleucina 2 (IL-2).

13. El método de la reivindicación 12, que comprende poner en contacto dicho linfocito T primario, en el que dicho linfocito T primario es un linfocito T primario humano, en presencia de dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina e interleucina 2 (IL-2), con

- (i) dicho BX795,
- (ii) comprendiendo dicho vector lentiviral o vector retroviral dicho ácido nucleico, en donde dicho ácido nucleico codifica un receptor de antígeno quimérico y

mediante el que dicho ácido nucleico se transduce en dicho linfocito T primario humano; en donde dicho BX795 está a una concentración de 6 μ M; y

en donde dicha puesta en contacto de dicho linfocito T primario humano con dicho BX795 se produce durante tres horas, seguido de al menos seis horas de puesta en contacto concurrente de dicho linfocito T primario humano con dicho vector lentiviral o vector retroviral y dicho BX795.

5

14. El método de la reivindicación 12, que comprende poner en contacto dicho linfocito T primario, en donde dicho linfocito T primario es un linfocito T primario humano, en presencia de dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina e interleucina 2 (IL-2), con

(i) dicha 2-Aminopurina,

(ii) comprendiendo dicho vector lentiviral o vector retroviral dicho ácido nucleico, en donde dicho ácido nucleico codifica un receptor de antígeno quimérico y

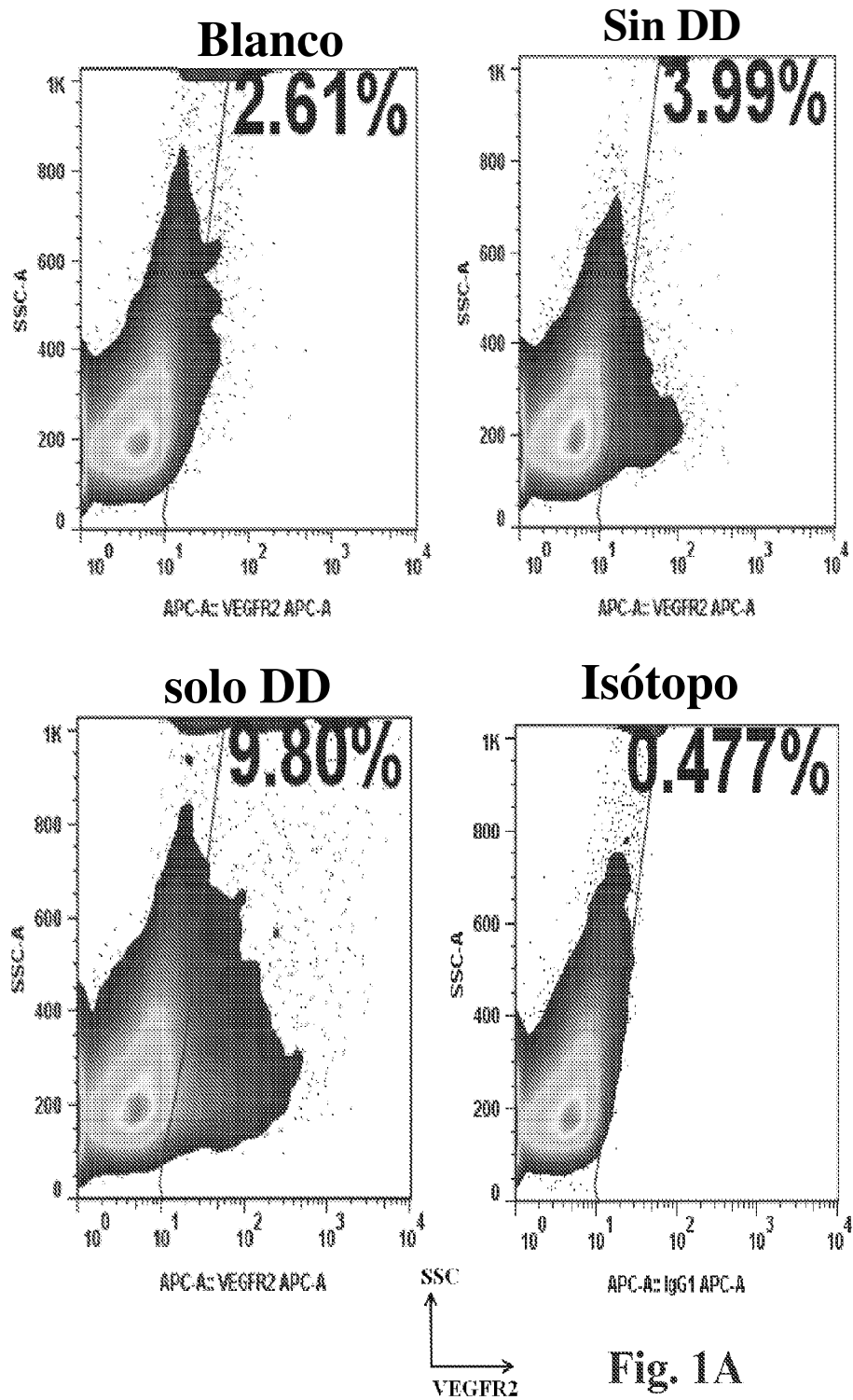
10

mediante el cual dicho ácido nucleico se transduce a dicho linfocito T humano primario,

en donde dicha 2-Aminopurina está a una concentración de 2.5-10 mM; y

en donde dicha puesta en contacto de dicho linfocito T humano con dicha 2-Aminopurina se produce durante 90 minutos, seguido de al menos cinco horas de puesta en contacto concurrente de dicho linfocito T humano con dicho vector lentiviral o vector retroviral y dicha 2-Aminopurina.

15



DEAE-Dextrano + BX795 (μM)

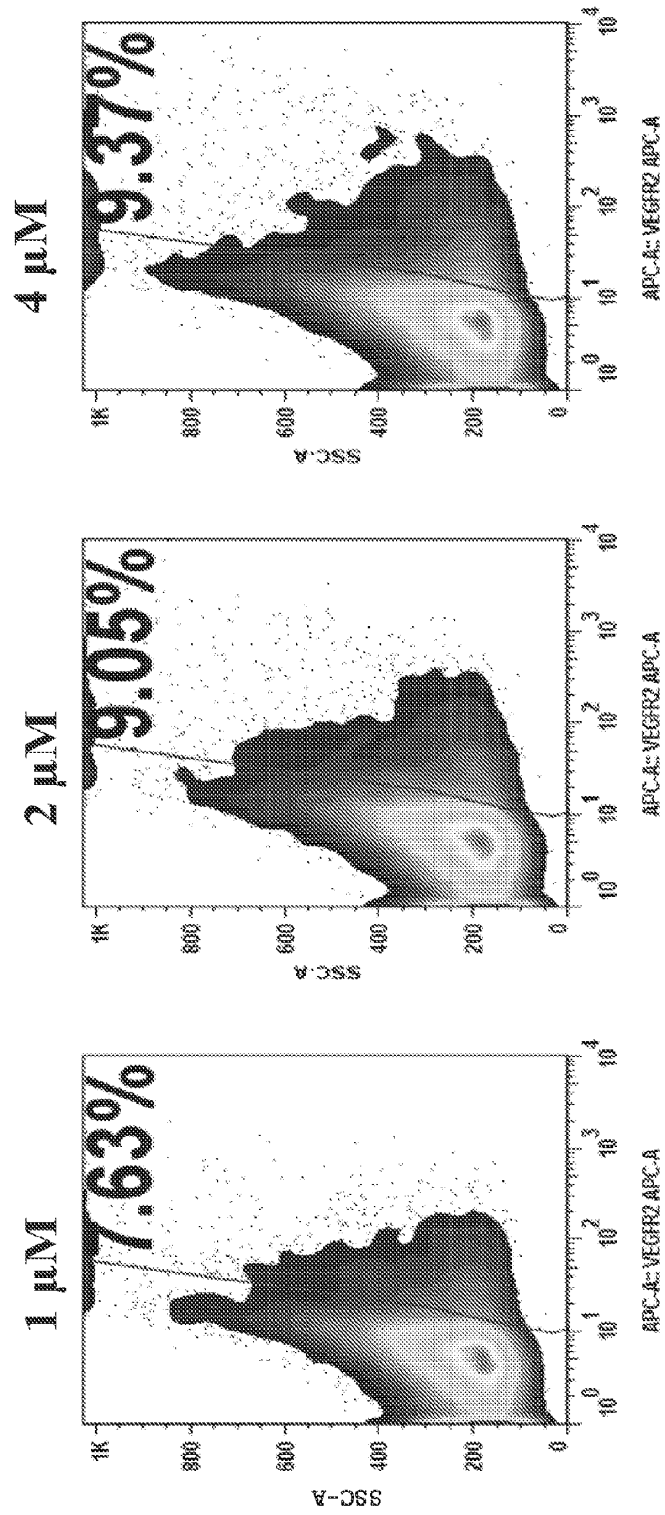


Fig. 1B -1

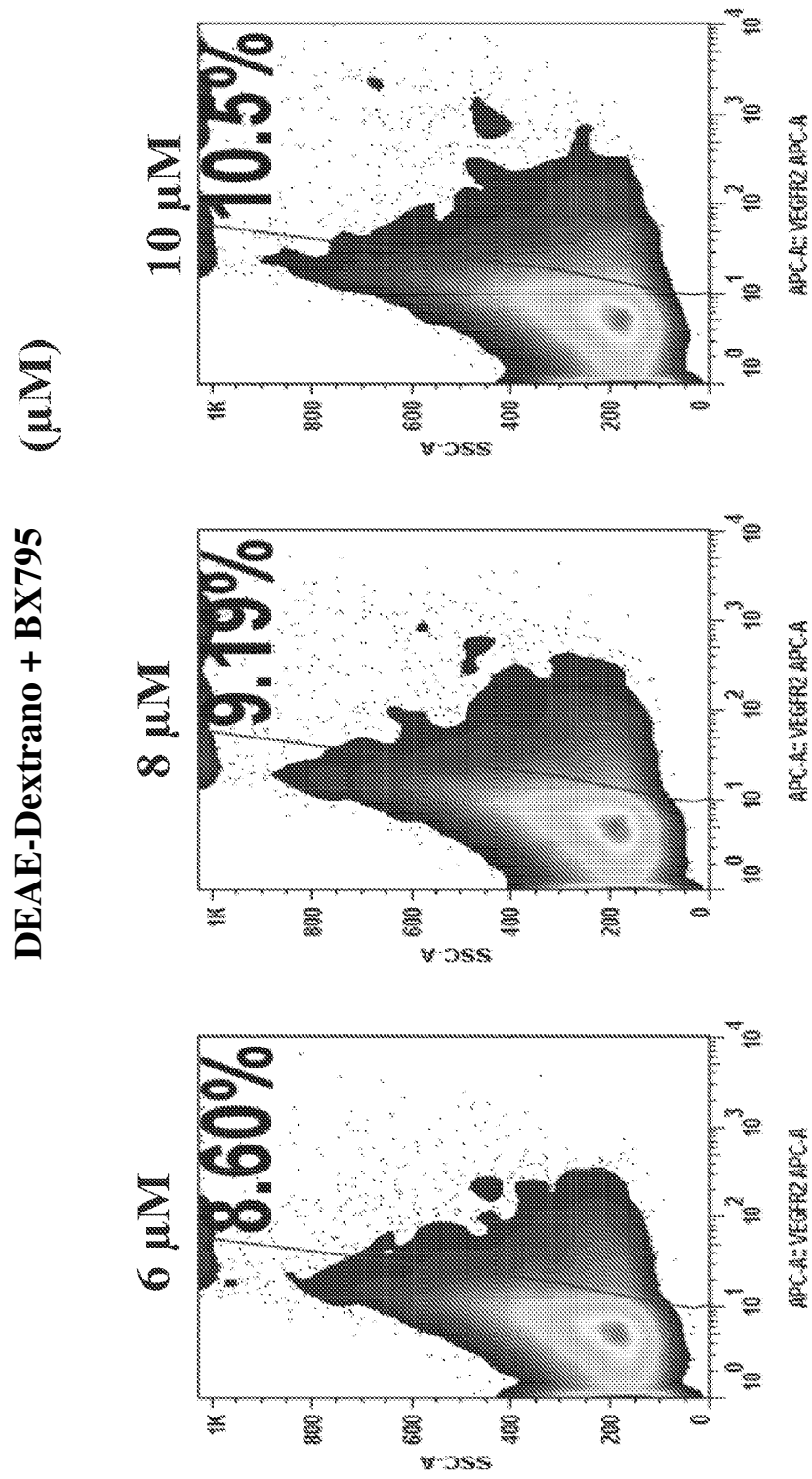
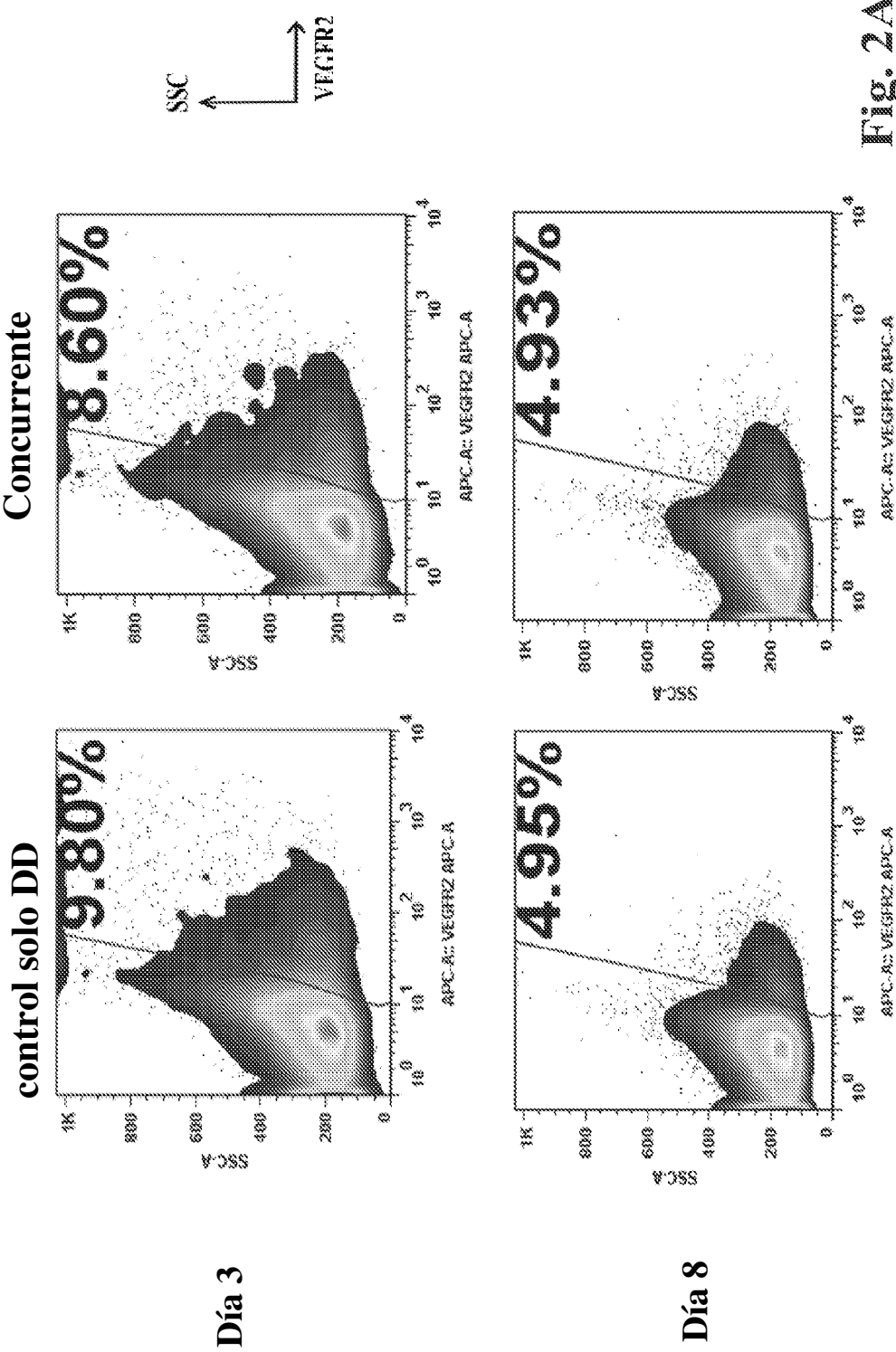
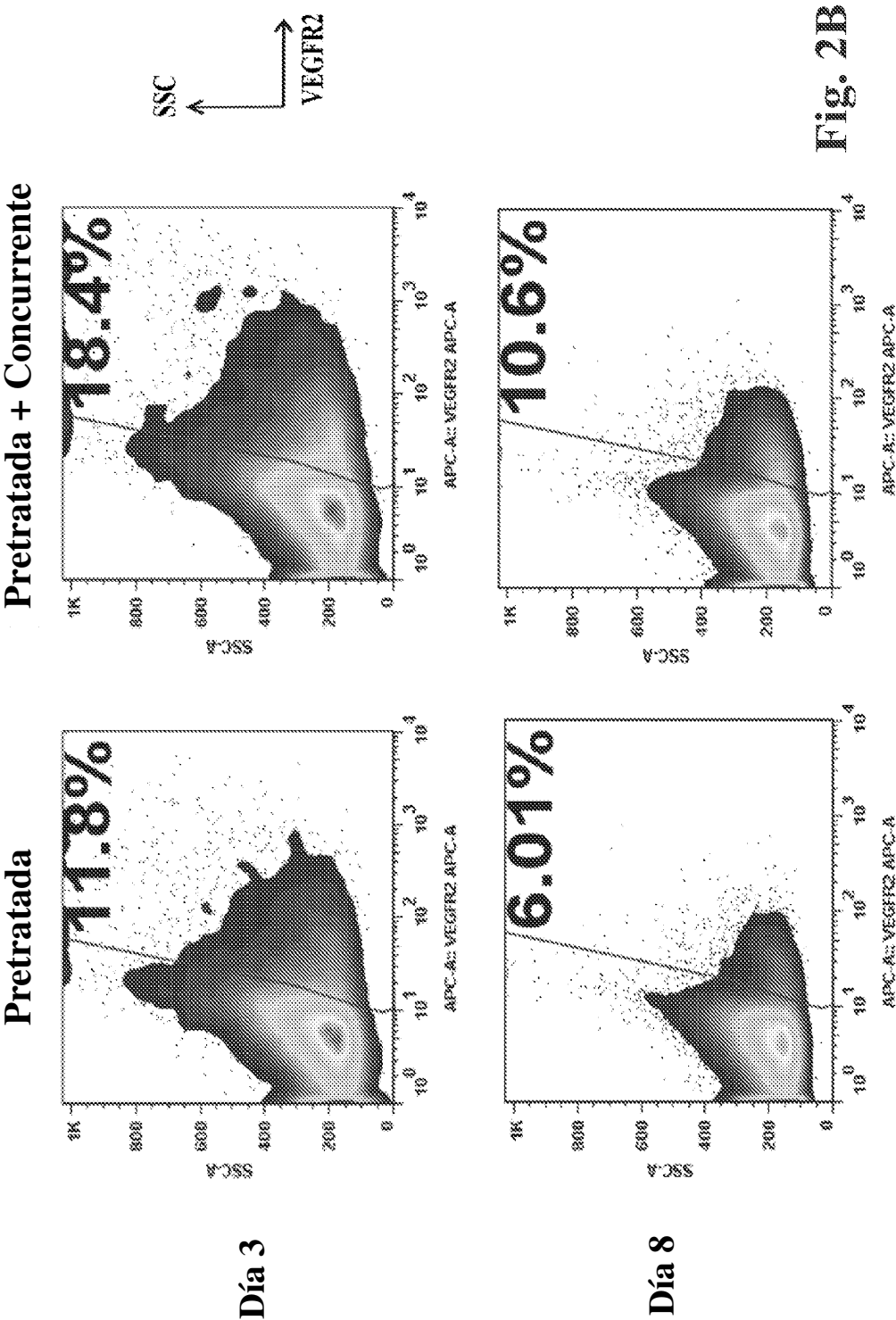
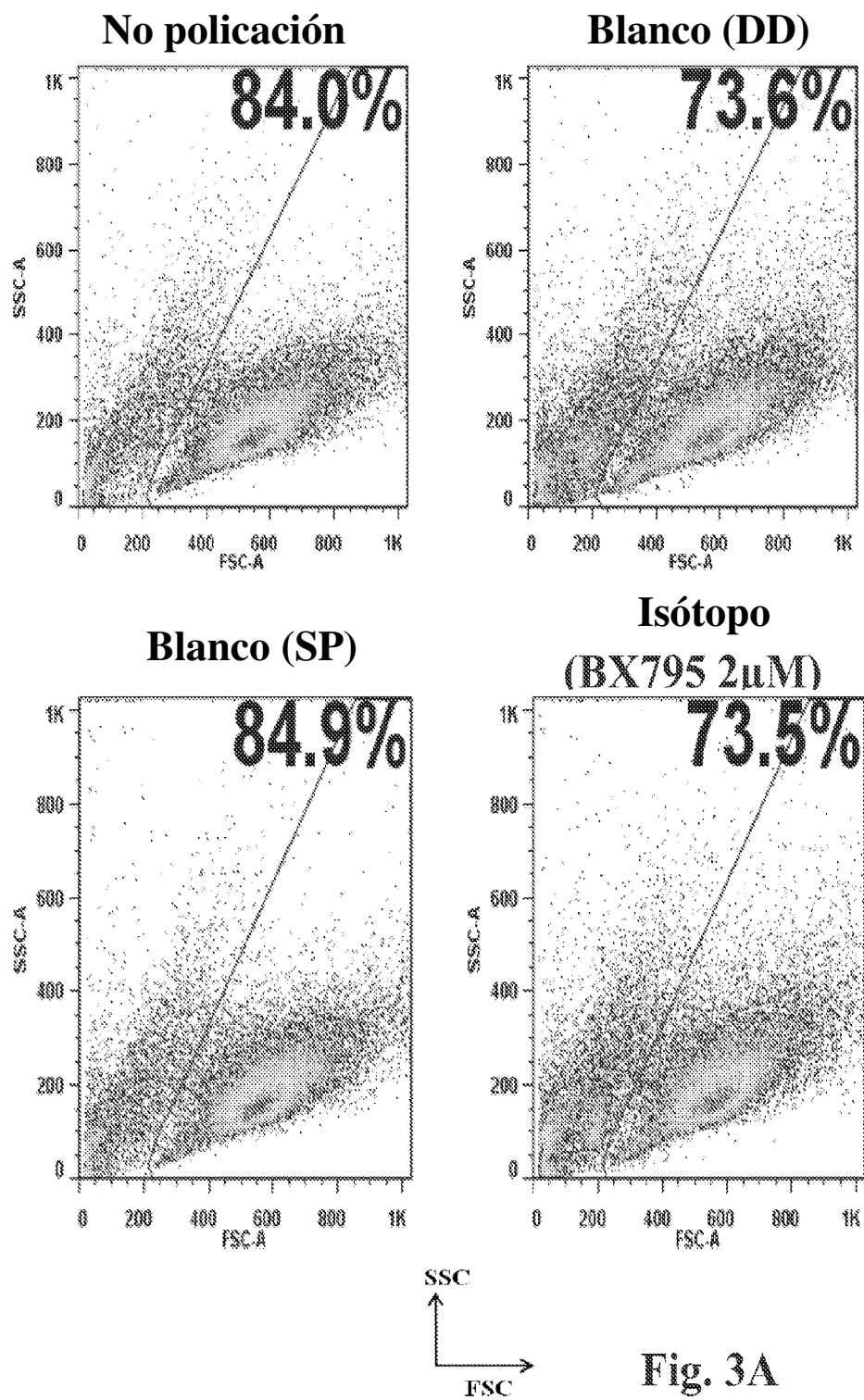


Fig. 1B -2







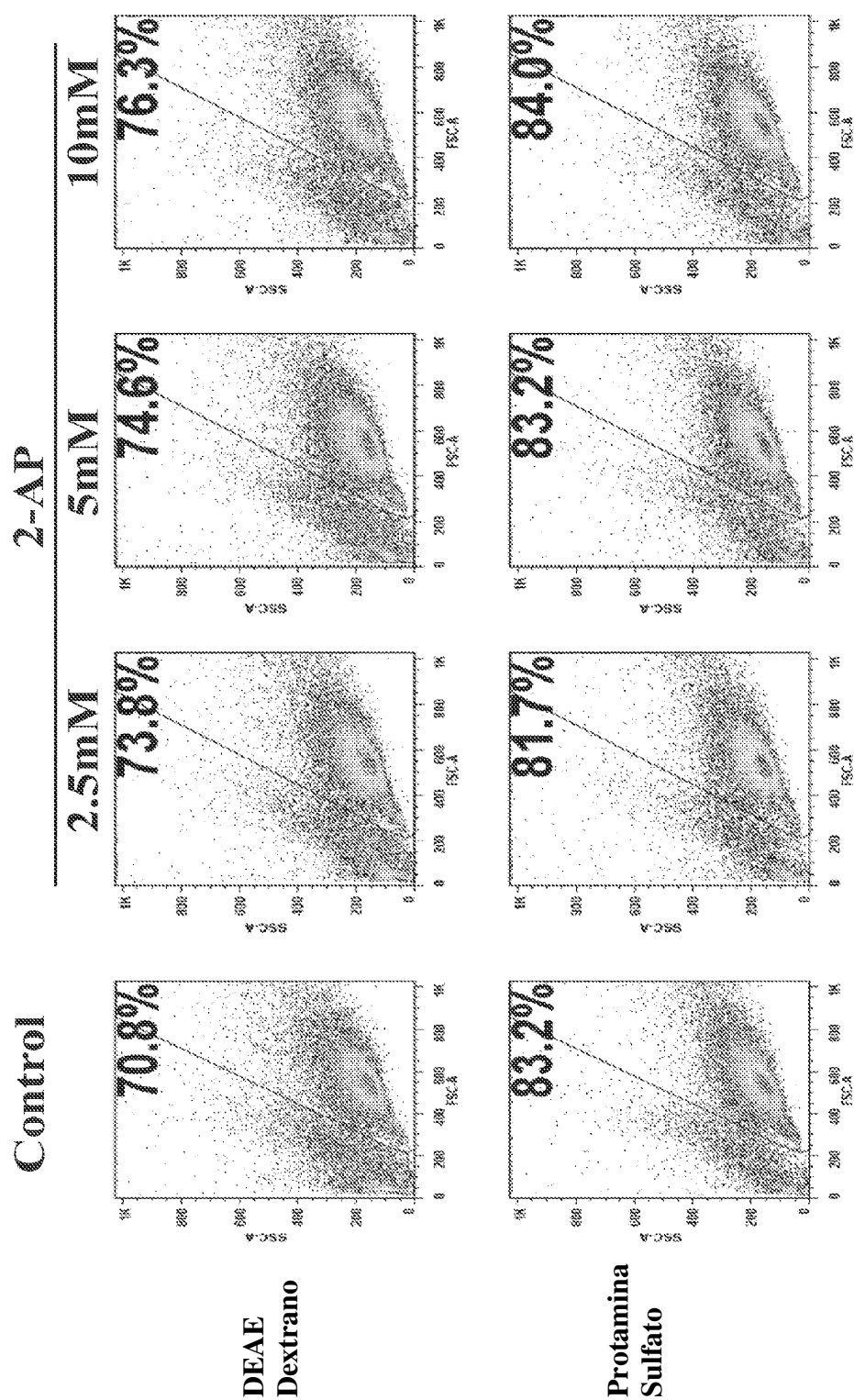


Fig. 3B

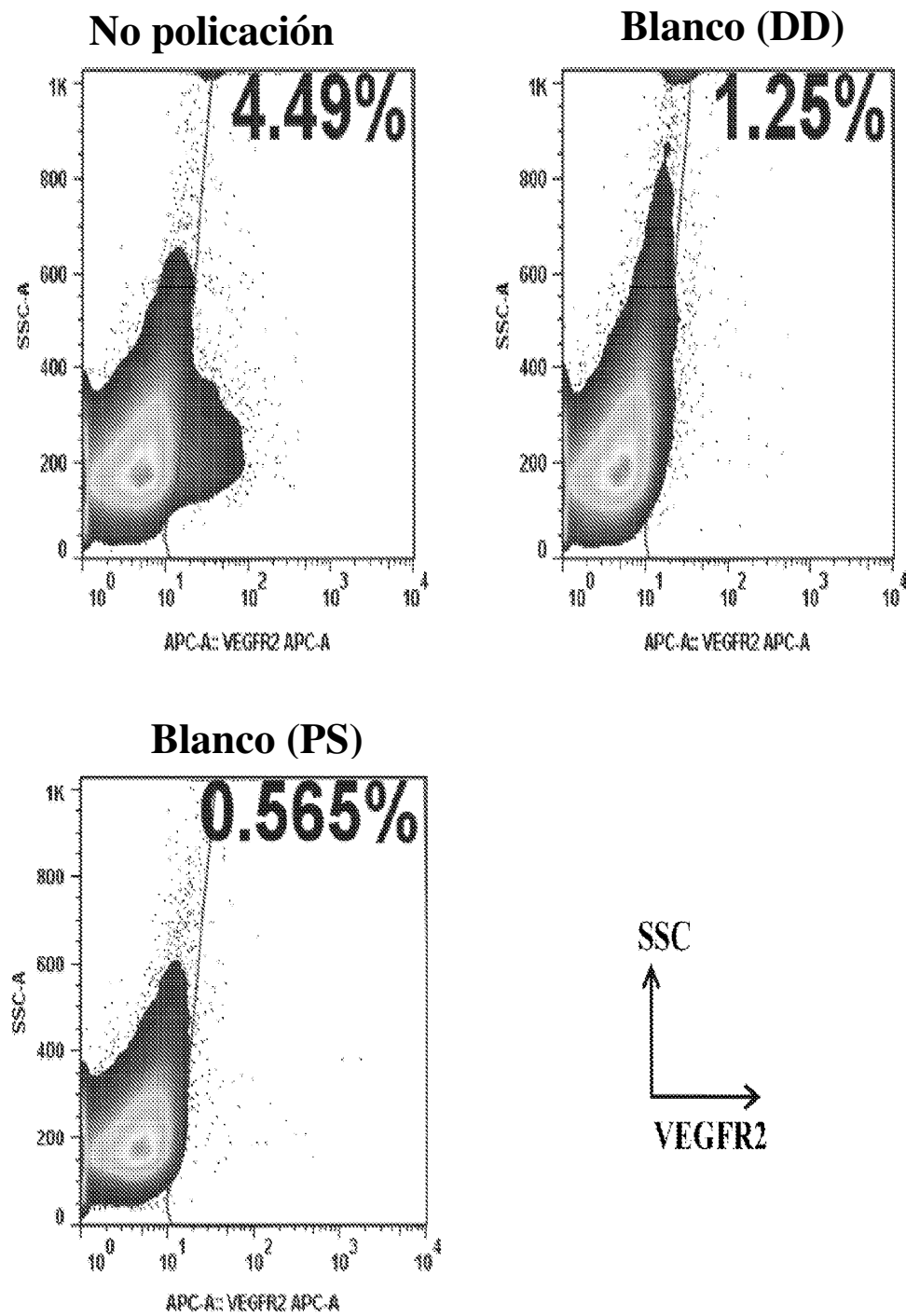
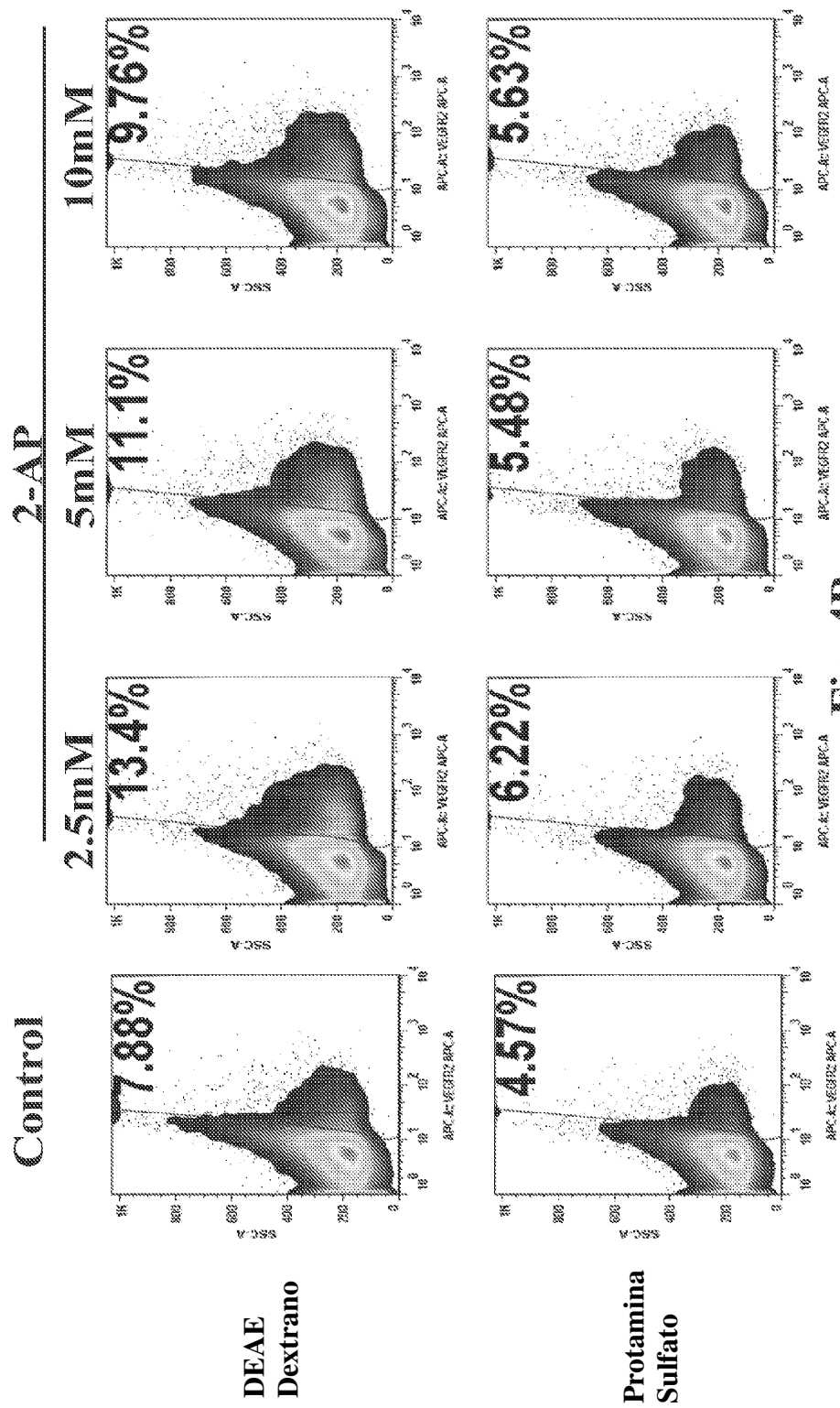


Fig. 4A



34567891011121314151617181920212223242526272829303132333435363738394041424344454647484950515253545556575859606162636465666768697071727374757677787980818283848586878889909192939495969798991001011021031041051061071081091101111121131141151161171181191201211221231241251261271281291301311321331341351361371381391401411421431441451461471481491501511521531541551561571581591601611621631641651661671681691701711721731741751761771781791801811821831841851861871881891901911921931941951961971981992002012022032042052062072082092102112122132142152162172182192202212222232242252262272282292302312322332342352362372382392402412422432442452462472482492502512522532542552562572582592602612622632642652662672682692702712722732742752762772782792802812822832842852862872882892902912922932942952962972982993003013023033043053063073083093103113123133143153163173183193203213223233243253263273283293303313323333343353363373383393403413423433443453463473483493503513523533543553563573583593603613623633643653663673683693703713723733743753763773783793803813823833843853863873883893903913923933943953963973983994004014024034044054064074084094104114124134144154164174184194204214224234244254264274284294304314324334344354364374384394404414424434444454464474484494504514524534544554564574584594604614624634644654664674684694704714724734744754764774784794804814824834844854864874884894904914924934944954964974984995005015025035045055065075085095105115125135145155165175185195205215225235245255265275285295305315325335345355365375385395405415425435445455465475485495505515525535545555565575585595605615625635645655665675685695705715725735745755765775785795805815825835845855865875885895905915925935945955965975985996006016026036046056066076086096106116126136146156166176186196206216226236246256266276286296306316326336346356366376386396406416426436446456466476486496506516526536546556566576586596606616626636646656666676686696706716726736746756766776786796806816826836846856866876886896906916926936946956966976986997007017027037047057067077087097107117127137147157167177187197207217227237247257267277287297307317327337347357367377387397407417427437447457467477487497507517527537547557567577587597607617627637647657667677687697707717727737747757767777787797807817827837847857867877887897907917927937947957967977987998008018028038048058068078088098108118128138148158168178188198208218228238248258268278288298308318328338348358368378388398408418428438448458468478488498508518528538548558568578588598608618628638648658668678688698708718728738748758768778788798808818828838848858868878888898908918928938948958968978988999009019029039049059069079089099109119129139149159169179189199209219229239249259269279289299309319329339349359369379389399409419429439449459469479489499509519529539549559569579589599609619629639649659669679689699709719729739749759769779789799809819829839849859869879889899909919929939949959969979989991000100110021003100410051006100710081009101010111012101310141015101610171018101910201021102210231024102510261027102810291030103110321033103410351036103710381039104010411042104310441045104610471048104910501051105210531054105510561057105810591060106110621063106410651066106710681069107010711072107310741075107610771078107910801081108210831084108510861087108810891090109110921093109410951096109710981099110011011102110311041105110611071108110911101111111211131114111511161117111811191120112111221123112411251126112711281129113011311132113311341135113611371138113911401141114211431144114511461147114811491150115111521153115411551156115711581159116011611162116311641165116611671168116911701171117211731174117511761177117811791180118111821183118411851186118711881189119011911192119311941195119611971198119912001201120212031204120512061207120812091210121112121213121412151216121712181219122012211222122312241225122612271228122912301231123212331234123512361237123812391240124112421243124412451246124712481249125012511252125312541255125612571258125912601261126212631264126512661267126812691270127112721273127412751276127712781279128012811282128312841285128612871288128912901291129212931294129512961297129812991300130