

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 816 450**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2013 PCT/US2013/027366**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO13126733**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2013 E 13751777 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020 EP 2817330**

54 Título: **Uso de CAR basados en ICOS para mejorar la actividad antitumoral y la persistencia del CAR**

30 Prioridad:

**22.02.2012 US 201261601910 P**

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

**05.04.2021**

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (100.0%)**

**3600 Civic Center Boulevard, 9th Floor Philadelphia PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**JUNE, CARL, H.;**  
**GUEDAN CARRIO, SONIA;**  
**ZHAO, YANGBING y**  
**SCHOLLER, JOHN**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI , Peter**

**ES 2 816 450 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**

Uso de CAR basados en ICOS para mejorar la actividad antitumoral y la persistencia del CAR

**5 Antecedentes de la invención**

El desarrollo de linfocitos T que se modifican genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (Chimeric Antigen Receptor, CAR) ha abierto la puerta a muchas posibles nuevas terapias para el cáncer y otros trastornos. En general, los CAR comprenden un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular y un dominio intracelular. La composición exacta del dominio intracelular puede proporcionar características únicas para el CAR y para la población celular que expresa el CAR.

El CD278 o coestimulador inducible de linfocitos T (Inducible T-cell COStimulator, ICOS) es una molécula coestimuladora que generalmente se expresa en los linfocitos T activados. Se ha demostrado que, además de CD28, la señalización a través del coestimulador inducible (ICOS, también llamado CD278) es necesaria para la secreción óptima de citocinas, porque ambas moléculas son esenciales para la secreción óptima de IL-17A por los linfocitos Th17 de murino (Park et al., 2005 Nat. Immunol. 6:1133-1141). Los hallazgos recientes en modelos de murino han revelado que ICOS amplifica las respuestas de Th17 induciendo la expresión del factor de transcripción c-MAF y, por lo tanto, transactivando la producción de IL-21 (Bauquet et al., 2009 Nat. Immunol. 10:167-175). Si bien se han generado receptores quiméricos que comprenden ICOS (Publicación de Patente de EE.UU. US2006/0247191), se desconoce qué papel tiene el dominio ICOS en la influencia de la actividad antitumoral mediada por CAR, la proliferación de Treg mediada por CAR o la persistencia de linfocitos T.

Dependiendo de las señales microambientales presentes, los linfocitos T CD4+ sin exposición previa se pueden diferenciar en uno de varios linajes de linfocitos T colaboradores (T Helper, TH), incluyendo TH1, TH2, Th17, TH22 y linfocitos T reguladores (Treg) (O'Shea et al., 2010 Science 327:1098-1102; Murphy et al., 2010 Nat. Immunol. 11:674-680). Los linfocitos Th17 aumentan la defensa del hospedador, tienen un papel importante en la inmunidad de la mucosa, mejoran una serie de enfermedades autoinmunes y liberan citocinas, incluyendo IL-17A e IL-17F (documento description.doc, adaptado de la memoria descriptiva EP95053-6060WO1, Korn et al., 2009 Annu. Rev. Immunol. 27:485-517). La contribución de los linfocitos Th17 a la inmunidad tumoral varía, lo que demuestra el potencial de actividad antitumoral y protumorigénica (Zou et al., 2010 Nat. Rev. Immunol. 10:248-256). Por lo tanto, la identificación de los mecanismos que controlan las respuestas de los Th17 es esencial para comprender la inmunidad tumoral. A pesar de los avances recientes en las terapias basadas en CAR para el tratamiento del cáncer, todavía no se conoce ninguna terapia con linfocitos Th17 genéticamente redirigidos.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente en la técnica de composiciones y métodos para el tratamiento del cáncer usando CAR que aumenten la actividad antitumoral y la persistencia de los linfocitos Th17 genéticamente redirigidos. La presente invención aborda esta necesidad.

**40 Sumario de la invención**

El objeto de la presente invención es tal como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

La invención proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular ICOS, en donde dicho dominio ICOS está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6.

En una realización, la secuencia de ácido nucleico del CAR comprende además un dominio de señalización de CD3zeta.

En una realización, la secuencia de ácido nucleico aislada del CAR comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 8.

En una realización, el dominio de unión a antígeno es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización, el fragmento de unión a antígeno es un Fab o un scFv.

En una realización, el dominio de unión a antígeno se une a un antígeno tumoral. En una realización, el antígeno tumoral está asociado con una neoplasia hematológica. En una realización, el antígeno tumoral está asociado con un tumor sólido.

En una realización, el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, glucolípidio F77, EGFRvIII, GD-2, el TCR de NY-ESO-1, el TCR de MAGE A3 y cualquier combinación de los mismos.

5 En una realización, la secuencia de ácido nucleico del CAR comprende además una región de señalización coestimuladora que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (Lymphocyte Function-associated Antigen, LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83 y cualquier combinación de los mismos.

El dominio de señalización intracelular ICOS está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6.

10 En una realización, el dominio de señalización CD3 zeta está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 7.

15 La invención también proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular ICOS, en donde dicho dominio ICOS está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6.

20 La invención también proporciona una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular ICOS, en donde dicho dominio ICOS está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, en donde la célula se selecciona del grupo que consiste en un linfocito Th17 y un linfocito Tc17.

25 La invención también proporciona una célula genéticamente modificada para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular ICOS, en donde dicho dominio ICOS está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, en donde la célula se selecciona del grupo que consiste en un linfocito Th17 y un linfocito Tc17, para su uso en un método de

30 a) estimular una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T a una población celular o tejido diana en el mamífero, comprendiendo el método administrar a un mamífero una cantidad eficaz de la célula modificada genéticamente para expresar un CAR:

35 b) proporcionar una inmunidad antitumoral en un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR, proporcionando así una inmunidad antitumoral en el mamífero; o

40 c) tratar a un mamífero que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociada con una expresión elevada de un antígeno tumoral, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR, tratando así al mamífero.

En una realización, la célula se selecciona del grupo que consiste en un linfocito Th17 autólogo y un linfocito Tc17 autólogo.

45 La invención también proporciona una célula genéticamente diseñada para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular ICOS, en donde dicho dominio ICOS está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, en donde la célula se selecciona del grupo que consiste en un linfocito Th17 y un linfocito Tc17, para su uso en un método de tratamiento de un ser humano con cáncer, comprendiendo el método administrar al ser humano la célula modificada genéticamente para expresar un CAR.

50 En una realización, el ser humano es resistente a al menos un agente quimioterapéutico.

55 La invención también proporciona una célula genéticamente diseñada para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular ICOS, en donde dicho dominio ICOS está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, en donde la célula se selecciona del grupo que consiste en un linfocito Th17 y un linfocito Tc17, para su uso en un método para generar una población persistente de linfocitos T genéticamente modificados en un ser humano diagnosticado con cáncer, comprendiendo el método administrar al ser humano una célula modificada genéticamente para que exprese un CAR, en donde la población persistente de células modificadas genéticamente persiste en el ser humano durante al menos un mes después de la administración.

60 En una realización, la población persistente de linfocitos T genéticamente modificados comprende al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula que se administró al ser humano, una progenie de una célula que se administró al ser humano, y una combinación de las mismas.

65 En una realización, la población persistente de linfocitos T genéticamente modificados comprende un linfocito T de

memoria.

En una realización, la población persistente de células modificadas genéticamente persiste en el ser humano durante al menos tres meses después de la administración.

5 En una realización, la población persistente de linfocitos T genéticamente modificados persiste en el ser humano durante al menos cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, dos años o tres años después de la administración.

10 La invención también proporciona una célula genéticamente diseñada para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular ICOS, en donde dicho dominio ICOS está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, en donde la célula se selecciona del grupo que consiste en un linfocito Th17 y un linfocito Tc17, para su uso en un método de expansión de una población de linfocitos T genéticamente modificados en un ser humano diagnosticado con cáncer, comprendiendo el método administrar al ser humano una célula modificada genéticamente para que exprese un CAR, además, en el que la célula administrada genéticamente modificada produce una población de progenie de linfocitos T en el ser humano.

### 20 Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención se entenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. A fin de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos las realizaciones que se prefieren actualmente. Debe entenderse que, sin embargo, la invención no está limitada a las disposiciones precisas e instrumentos de las realizaciones mostradas en los dibujos.

25 La Figura 1 representa la secuencia de nucleótidos de SS1-ICOS-z. La secuencia de ADNc que contiene el SS1-ICOS-z CAR se clonó en un vector lentivírico de tercera generación y se expresó bajo el control del promotor EF-1 (SEQ ID NO: 16). El SS1-ICOS-z contiene la secuencia líder CD8, el fragmento de cadena única SS1 que reconoció la mesotelina humana, la región de bisagra de la cadena CD8 $\alpha$ , los dominios transmembrana e intracelular ICOS, y el dominio de transducción de señales TCR-z.

30 La Figura 2, que comprende la Figura 2A y la Figura 2B, representa la generación de linfocitos Th17 redirigidos. La Figura 2A ilustra una representación esquemática de un panel de receptores quiméricos que contienen el fragmento de cadena única SS1 y difieren en el dominio intracelular. El nuevo CAR basado en ICOS contiene el dominio de transducción de señal TCR-zeta con el dominio intracelular ICOS en tándem. La Figura 2B ilustra los resultados de un ensayo de citometría de flujo que evalúa la expresión de proteínas de fusión scFv SS1 en linfocitos T CD4+ primarios humanos, normalizada al 60 % de expresión del receptor quimérico para todos los receptores.

35 La Figura 3 muestra los resultados de experimentos de ejemplo que demuestran que los linfocitos Th17 redirigidos con un CAR basado en ICOS liberan altas cantidades de IL17-A, IL-17F y CCL20 pero bajas cantidades de IL-2. Los linfocitos Th17 ( $4 \times 10^5$ , 60% de receptor quimérico positivo) se cocultivaron con  $2 \times 10^5$  células K562meso en medios de cultivo sin citocinas polarizadoras de Th17 o IL-2. Los sobrenadantes se obtuvieron 24 h después del cocultivo, y la producción de citocinas se analizó por ELISA. Las barras de error indican la desviación típica (DT) en muestras por triplicado. Representativo de tres experimentos.

40 La Figura 4 representa los resultados de un experimento de ejemplo que demuestra que ICOS aumenta la producción de IL-17A por los linfocitos Th17 humanos. Los linfocitos T<sub>H</sub>17 de 5 donantes normales diferentes ( $4 \times 10^5$ , 60% de receptor quimérico positivo) se cocultivaron con  $2 \times 10^5$  células mesoK562 en medios de cultivo sin citocinas polarizadoras de Th17 o IL-2. Los sobrenadantes se obtuvieron 24 h después del cocultivo, y la producción de IL-17A se analizó por ELISA.

45 La Figura 5, que comprende las Figuras 5A a la Figura 5C, representa los resultados de experimentos de ejemplo que demuestran que los linfocitos Th17 redirigidos con un CAR basado en ICOS liberan altas cantidades de IL17-A e IFN $\gamma$  pero bajas cantidades de IL-2 después del reconocimiento de antígeno en las células tumorales. Linfocitos Th17 ( $4 \times 10^5$ , 60% de receptor quimérico positivo) se cocultivaron con  $2 \times 10^5$  células K562, K562meso o las células tumorales indicadas en medios de cultivo sin citocinas polarizadoras de Th17 o IL-2. Los sobrenadantes se obtuvieron 24 h después del cocultivo y (A) la IL-17A, (B) la IL-2 y (C) el IFN $\gamma$  se analizaron por ELISA. Las barras de error indican la desviación típica (DT) en muestras duplicadas.

50 La Figura 6, que comprende la Figura 6 A y la Figura 6 B, representa los resultados de experimentos de ejemplo que evalúan la actividad citolítica de los linfocitos Th17/Tc17 redirigidos con receptores quiméricos. Una mezcla de linfocitos Tc17 y Th17 (en una proporción de 4:1) se cocultivó con células diana L55 teñidas con CFSE en las proporciones efector-diana indicadas (E:D) durante 4 h. La Figura 6A ilustra la citólisis específica, tal como se determina usando un ensayo basado en citometría de flujo. La Figura 6B representa la DE50, según lo determinado para cada grupo utilizando el modelo de regresión logística de cuatro parámetros. Representativo de cuatro experimentos.

La Figura 7, que comprende la Figura 7 A y la Figura 7 B, representa los resultados de experimentos de ejemplo que demuestran que los linfocitos Th17/Tc17 redirigidos con un CAR basado en ICOS erradicar tumores preestablecidos grandes y muestran una mayor persistencia *in vivo*. Los tumores humanos primarios M108 se establecieron en los flancos de los ratones NSG. Después de 8 semanas, cuando los tumores alcanzaron un volumen de 500 mm<sup>3</sup>, los ratones fueron tratados con 2 inyecciones intratumorales de 10 x 10<sup>6</sup> linfocitos Th17/Tc17 (80 %/60 % de receptores quiméricos positivos) o PBS en los días 61 y 67. La Figura 7A representa el volumen tumoral medio (+/- EEM) con n = 9 para todos los grupos. La sangre periférica de ratones NSG con M108 tratados con inyecciones intratumorales de linfocitos Th17/Tc17 redirigidos se obtuvo el día 51 después de la infusión de linfocitos T por punción intracardiaca. La Figura 7B ilustra la cuantificación de la presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> humanos mediante un ensayo FACS Truocount. Los resultados se expresan como un recuento medio absoluto de linfocitos T por µl de sangre periférica +/- DT (n = 9 para todos los grupos).

La Figura 8, que comprende las Figuras 8A a 8D, demuestra que los linfocitos T<sub>H</sub>17 redirigidos con ICOSz mostraron una mayor expresión de CD161. Los linfocitos T<sub>H</sub>17 se cocultivaron con APC irradiadas que expresaban mesotelina. Las Figuras 8A y 8B representan la expresión de CD161 por linfocitos T CAR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> en respuesta a la estimulación específica de mesotelina se analizaron mediante citometría de flujo en los puntos de tiempo indicados. La Figura 8C muestra el porcentaje de linfocitos T CAR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> que expresan CD161 en el día 8 en varios donantes normales diferentes (n = 9). La Figura 8D representa la expresión de CD161 en células CAR<sup>+</sup> y CAR<sup>-</sup> en el día 8. Las barras de error representan el EEM (5 donantes normales diferentes).

La Figura 9, que comprende la Figura 9 A y la Figura 9 B, representa los resultados de experimentos de ejemplo utilizando CAR que incluyen una combinación de ICOS con otros dominios coestimuladores. La Figura 9A representa el CAR basado en ICOS que contiene el dominio de transducción de señal TCR-zeta con los dominios coestimuladores ICOS y CD137 (4-1BB) por triplicado. La Figura 9B representa gráficos que ilustran que la incorporación del dominio de señalización CD137 en combinación con ICOS no alteró el perfil de citocinas de los linfocitos Th17 redirigidos con un CAR que contiene solo el dominio coestimulador ICOS. Los linfocitos Th17 (4 x 10<sup>5</sup>, 60% de receptor quimérico positivo) se cocultivaron con 2 x 10<sup>5</sup> células K562, K562meso o las células tumorales indicadas en ausencia de citocinas exógenas. Los sobrenadantes se obtuvieron 24 h después del cocultivo y la IL-17A, la IL-2 y el IFN $\gamma$  se analizaron por ELISA. Las barras de error indican la desviación típica (DT) en muestras duplicadas.

La Figura 10, que comprende las Figuras 10A a 10C, es una serie de imágenes que demuestran que los linfocitos T<sub>H</sub>17 redirigidos con ICOSz mostraron una mayor expresión de genes relacionados con T<sub>H</sub>17. Los linfocitos T<sub>H</sub>17 redirigidos se estimularon con mesotelina recombinante que proviene de levadura inmovilizada. Los niveles de expresión génica se determinaron el día 0 antes de la estimulación y 4 h, 8 h, 24h y 96 h tras el reconocimiento de antígeno. La Figura 10A representa la expresión Log<sub>2</sub> normalizada de genes expresados diferencialmente seleccionados (FC>2, FDR<0,05). Las barras de error representan el EEM (3 donantes normales diferentes). La Figura 10B representa un mapa de calor del múltiplo de variación de log<sub>2</sub> en la expresión de genes distintivos de los linfocitos T colaboradores a las 4h en relación con 0 h. La Figura 3C representa un mapa de calor del enriquecimiento de la vía de la inventiva (IPA, p <0,01).

### Descripción detallada

La invención se refiere a composiciones y a sus usos para tratar el cáncer, incluyendo, pero sin limitación, neoplasias hematológicas y tumores sólidos. La presente invención se refiere a una estrategia de transferencia celular adoptiva de linfocitos Th17 transducidos para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR). Los CAR son moléculas que combinan la especificidad basada en anticuerpos para un antígeno deseado (por ejemplo, antígeno tumoral) con un dominio intracelular que activa el receptor de linfocitos T para generar una proteína quimérica que exhibe una actividad inmunitaria celular antitumoral específica.

La presente invención se refiere en general al uso de linfocitos T genéticamente modificados para expresar un CAR deseado. Los linfocitos T que expresan un CAR se denominan en el presente documento linfocitos T CAR o linfocitos T modificados con CAR. Preferentemente, la célula se puede modificar genéticamente para expresar un dominio de unión a anticuerpo en su superficie, lo que confiere una especificidad de antígeno novedosa que es independiente del MHC. En algunos casos, el linfocito T se modifica genéticamente para expresar un CAR que combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con un dominio intracelular de la cadena CD3-zeta o proteína Fc $\gamma$ RI en una sola proteína quimérica.

El CAR de la invención comprende un dominio extracelular que tiene un dominio de reconocimiento de antígeno, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. En una realización, se utiliza el dominio transmembrana que se asocia de forma natural a uno de los dominios en el CAR. En otra realización, el dominio transmembrana se puede seleccionar o modificar mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana superficial para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. En algunas realizaciones, el dominio extracelular también comprende un dominio de bisagra. Preferentemente, el dominio de bisagra comprende el dominio de bisagra CD8 $\alpha$ .

Con respecto al dominio citoplasmático, el CAR de la invención se ha diseñado para comprender el dominio de señalización ICOS codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6 por sí mismo o combinado con cualquier otro dominio citoplasmático deseado útil en el contexto del CAR de la invención. En una realización, el dominio citoplasmático del CAR se puede diseñar para que comprenda además los dominios de señalización de CD3-zeta, 4-1BB y/o CD28. Por ejemplo, el dominio citoplasmático del CAR puede incluir, pero sin limitación, los módulos de señalización CD3-zeta, 4-1BB y CD28 y combinaciones de los mismos. Por consiguiente, la invención proporciona linfocitos T con CAR y su uso en métodos de terapia adoptiva.

En una realización, los linfocitos T con CAR de la invención se pueden generar mediante la introducción de un vector lentivírico que comprende un CAR deseado, por ejemplo un CAR que comprende anti-mesotelina, bisagra CD8 $\alpha$ , dominio transmembrana ICOS y dominios de señalización ICOS y CD3zeta humanos, en las células. En una realización, los linfocitos T CAR de la invención son capaces de replicarse *in vivo* dando como resultado una persistencia a largo plazo que puede llevar a un control tumoral sostenido.

En otra realización, los linfocitos T con CAR de la invención se pueden generar mediante la transfección de un ARN que codifica el CAR deseado, por ejemplo un CAR que comprende anti-mesotelina, bisagra CD8 $\alpha$ , dominio transmembrana ICOS y dominios de señalización ICOS y CD3zeta humanos, en las células. En una realización, el CAR se expresa transitoriamente en los linfocitos T genéticamente modificados con CAR.

En una realización, la invención se refiere a un linfocito T genéticamente modificado que expresa un CAR tal como se especifica en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de un paciente que tiene cáncer o está en riesgo de tener cáncer usando infusión de linfocitos. Preferentemente, la infusión de linfocitos autólogos se usa en el tratamiento. Las PBMC autólogas se recogen de un paciente que necesita tratamiento y los linfocitos T se activan y expanden usando los métodos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica y luego se infunden nuevamente en el paciente.

En una realización, la invención se refiere a linfocitos Th17 genéticamente modificados que expresan un CAR tal como se especifica en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de un paciente que tiene cáncer. La presente invención se basa en el hallazgo de que la inclusión del dominio de señalización ICOS dentro del dominio citoplasmático de un CAR tal como se especifica en el presente documento aumenta la persistencia de Th17, aumenta la producción de IL-17, aumenta la actividad antitumoral de los linfocitos Th17 y reduce la producción de IL-2. En una realización, la reducción de IL-2 producida por los linfocitos Th17 que expresan un ICOS que contiene CAR tal como se especifica en el presente documento reduce la proliferación de linfocitos Treg inmunosupresores.

En otra realización más, la invención se refiere generalmente a los linfocitos genéticamente modificados de la invención para su uso en un método de tratamiento de un paciente con riesgo de desarrollar cáncer. La invención también incluye las células genéticamente modificadas de la invención para su uso en un método de tratamiento de una neoplasia maligna o una enfermedad autoinmune en la que la quimioterapia y/o inmunoterapia en un paciente da como resultado una inmunosupresión significativa en el paciente, aumentando así el riesgo de que el paciente desarrolle cáncer.

La invención incluye el uso de linfocitos Th17 que expresan un CAR anti-mesotelina, incluyendo tanto CD3-zeta como el dominio coestimulador ICOS (también denominado linfocitos Th17 que expresan CAR) tal como se especifica en el presente documento. En una realización, los linfocitos Th17 que expresan CAR de la invención pueden experimentar una expansión consistente *in vivo* y se pueden establecer células de memoria específicas de antígeno que persisten en niveles altos durante un período prolongado en la sangre y la médula ósea. En algunos casos, los linfocitos Th17 que expresan CAR de la invención infundidos en un paciente pueden eliminar las células cancerosas *in vivo* en pacientes con una forma de cáncer. Sin embargo, la invención no se limita a linfocitos Th17 que expresan CAR. En cambio, la invención incluye cualquier dominio de unión a antígeno fusionado con un dominio de señalización intracelular ICOS codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, opcionalmente con uno o más dominios intracelulares seleccionados del grupo de dominio de señalización CD137 (4-1BB), un dominio de señalización de CD28, un dominio de señal de CD3zeta y cualquier combinación de los mismos.

## Definiciones

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la invención. Aunque en la práctica para el análisis de la invención también se puede usar cualquier método y material similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, se describen en el presente documento los materiales y métodos preferentes. Al describir y reivindicar la presente invención, se utilizará la siguiente terminología.

También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante.

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

5 "Aproximadamente", como se usa en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de  $\pm 20\%$  o  $\pm 10\%$ , más preferentemente  $\pm 5\%$ , incluso más preferentemente  $\pm 1\%$ , y aún más preferentemente  $\pm 0,1\%$  del valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados.

10 "Activación", tal como se usa en el presente documento, se refiere al estado de un linfocito T que ha sido suficientemente estimulado para inducir una proliferación celular detectable. La activación también puede estar asociada con la producción inducida de citocinas y funciones efectoras detectables. La expresión "linfocitos T activados" se refiere, entre otras cosas, a los linfocitos T que están en división celular.

15 El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente con un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas procedentes de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos son normalmente tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos en la  
20 presente invención pueden existir en una variedad de formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub>, así como anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos humanizados (Harlow et al., 1999, en: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, en: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).

25 La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y fragmentos Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos scFv y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

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

35 Una "cadena ligera de anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere al menor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus configuraciones de origen natural. Las cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$  se refieren a los dos isotipos principales de cadena ligera de los anticuerpos.

40 Por la expresión "anticuerpo sintético", como se usa en el presente documento, se entiende un anticuerpo que se genera usando tecnología de ADN recombinante, tales como, por ejemplo, un anticuerpo expresado mediante un bacteriófago tal como se describe en el presente documento. La expresión también debe interpretarse como un anticuerpo que ha sido generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y que la molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, donde la secuencia de ADN o de aminoácidos se ha obtenido usando tecnología de ADN sintético o de secuencia de aminoácidos que está disponible y es bien conocida en la técnica.

45 El término "antígeno" o "Ag", como se usa en el presente documento, se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. El experto en la materia comprenderá que cualquier macromolécula, incluidas prácticamente todas las proteínas o péptidos, puede servir como antígeno. Asimismo, los  
50 antígenos pueden proceder de ADN recombinante o genómico. Un experto en la materia comprenderá que cualquier ADN, que comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos parcial que codifica una proteína que provoca una respuesta inmunitaria, por lo tanto, codifica un "antígeno" como se usa ese término en el presente documento. Asimismo, un experto en la técnica comprenderá que un antígeno no necesita ser codificado únicamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Es evidente que la presente  
55 invención incluye, pero sin limitación, el uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos se disponen en varias combinaciones para provocar la respuesta inmune deseada. Además, un experto en la técnica comprenderá que un antígeno no necesita ser codificado por un "gen" en absoluto. Es evidente que un antígeno se puede generar sintetizado o proceder de una muestra biológica. Dicha muestra biológica puede incluir, pero sin limitación, una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un líquido  
60 biológico.

La expresión "efecto antitumoral", como se usa en el presente documento, se refiere a un efecto biológico que se puede manifestar mediante una disminución en el volumen tumoral, una disminución en el número de células tumorales, una disminución en el número de metástasis, un aumento en la esperanza de vida o mejora de varios  
65 síntomas fisiológicos asociados con la afección cancerosa. Un "efecto antitumoral" también se puede manifestar mediante la capacidad de los péptidos, polinucleótidos, células y anticuerpos de la invención en la prevención de la

aparición de tumores en primer lugar.

El término "autoantígeno" significa, de acuerdo con la presente invención, cualquier autoantígeno que el sistema inmunitario reconozca erróneamente como extraño. Los autoantígenos comprenden, pero sin limitación, proteínas celulares, fosfoproteínas, proteínas de la superficie celular, lípidos celulares, ácidos nucleicos, glucoproteínas, incluyendo receptores de superficie celular.

La expresión "enfermedad autoinmunitaria", como se usa en el presente documento, se define como un trastorno que resulta de una respuesta autoinmunitaria. Una enfermedad autoinmunitaria es el resultado de una respuesta inapropiada y excesiva a un autoantígeno. Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, hepatitis autoinmunitaria, parotiditis autoinmunitaria, enfermedad de Crohn, diabetes (Tipo I), epidermólisis ampollosa distrófica, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo vulgar, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, espondiloartropatías, tiroiditis, vasculitis, vitíligo, mixedema, anemia perniciosa, colitis ulcerativa, entre otros.

Tal como se usa en el presente documento, el término "autólogo" se refiere a cualquier material procedente del mismo individuo al que luego se reintroduce en el individuo.

"Alogénico" se refiere a un injerto procedente de un animal diferente de la misma especie.

"Xenogénico" se refiere a un injerto procedente de un animal de una especie diferente.

El término "cáncer", como se usa en el presente documento, se define como una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido e incontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden diseminarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Ejemplos de varios cánceres incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello de útero, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer cerebral, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares.

El "ligando coestimulador" como se usa el término en el presente documento, incluye una molécula en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una aAPC, célula dendrítica, linfocito B y similares) que se une específicamente a una molécula coestimuladora relacionada en un linfocito T, proporcionando de este modo una señal que, además de la señal primaria proporcionada mediante, por ejemplo, la unión de un complejo de TCR/CD3 con una molécula del MHC cargada con péptido, media en una respuesta de linfocitos T, incluyendo, pero sin limitación, proliferación, activación, diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, pero sin limitación, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM, por sus siglas en inglés), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor de linfotóxina beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, un agonista o anticuerpo que se une con el receptor de ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulador también abarca, entre otros, un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimuladora presente en un linfocito T, tales como, pero sin limitación, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1, por sus siglas en inglés), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente con CD83.

Una "molécula coestimuladora" se refiere al compañero de unión afín en un linfocito T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando de este modo en una respuesta coestimuladora mediante el linfocito T, tales como, pero sin limitación, proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero sin limitación, una molécula del MHC de clase I, BTLA y un receptor de ligando Toll.

Una "señal coestimuladora", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una señal, que, en combinación con una señal primaria, tal como la unión de TCR/CD3, conduce a la proliferación de linfocitos T y/o aumento o disminución de moléculas clave.

Una "enfermedad" es un estado de salud de un animal donde el animal no puede mantener la homeostasis y donde si la enfermedad no mejora, la salud del animal continúa deteriorándose. Por el contrario, un "trastorno" en un animal es un estado de salud en el que el animal puede mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si se deja sin tratar, un trastorno no necesariamente causa una disminución adicional en el estado de salud del animal.

Una "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico.

"Codificante" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas

en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de los mismos. Por lo tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm correspondiente a ese gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la

5 secuencia de ARNm y, por lo general, se proporciona en listados de secuencias, como la cadena no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, se pueden denominar codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

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

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

15 El término "expresión", como se usa en el presente documento, se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular dirigida por su promotor.

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

20 "Homólogo" se refiere a la similitud de secuencia o identidad de secuencia entre dos polipéptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. Cuando una posición en ambas secuencias comparadas está ocupada por la misma base o subunidad de monómero de aminoácido, por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias divididas por el número de posiciones comparadas X 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias son coincidentes u homólogas, entonces las dos secuencias son un 60 % homólogas. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN ATTGCC y TATGGC comparten un 50 % de homología. En general, se hace una comparación cuando dos secuencias se alinean para proporcionar la máxima homología.

25 El término "inmunoglobulina" o "Ig", como se usa en el presente documento, se define como una clase de proteínas, que funcionan como anticuerpos. Los anticuerpos expresados por los linfocitos B a veces se denominan BCR (receptor de linfocitos B) o receptor de antígeno. Los cinco miembros incluidos en esta clase de proteínas son IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. La IgA es el anticuerpo primario que está presente en las secreciones corporales, tales como saliva, lágrimas, leche materna, secreciones gastrointestinales y secreciones de moco de las vías respiratorias y genitourinarias. La IgG es el anticuerpo circulante más común. La IgM es la principal inmunoglobulina producida en la respuesta inmunitaria primaria en la mayoría de los sujetos. Es la inmunoglobulina más eficaz en aglutinación, fijación de complemento y otras respuestas de anticuerpos, y es importante en la defensa contra bacterias y virus. La IgD es la inmunoglobulina que no tiene una función de anticuerpo conocida, pero puede servir como un receptor de antígeno. La IgE es la inmunoglobulina que media la hipersensibilidad inmediata al provocar la liberación de mediadores de los mastocitos y basófilos tras la exposición al alérgeno.

30 Tal como se usa en el presente documento, un "material de formación" incluye una publicación, un registro, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad de las composiciones y métodos de la invención. El material de formación del kit de la invención puede, por ejemplo, fijarse a un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición de la invención o enviarse junto con un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición. Como alternativa, el material de formación puede enviarse por separado desde el recipiente con la intención de que el material de formación y el compuesto se utilicen cooperativamente por el receptor.

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

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

65 Salvo que se especifique otra cosa, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos"

incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede contener, en alguna versión, uno o más intrones.

5 Un "lentivirus", como se usa en el presente documento, se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus al ser capaces de infectar células que no se dividen; pueden administrar una cantidad significativa de información genética en el ADN de la célula hospedadora, por lo que son uno de los métodos más eficaces de un vector de administración de genes. El VIH, SIV y FIV son ejemplos de lentivirus. Los vectores procedentes de lentivirus ofrecen los medios para lograr niveles significativos de transferencia génica *in vivo*.

15 Por el término "modulación", tal como se usa en el presente documento, se entiende la mediación de un aumento o disminución detectable en el nivel de una respuesta en un sujeto en comparación con el nivel de una respuesta en el sujeto en ausencia de un tratamiento o compuesto, y/o en comparación con el nivel de una respuesta en un sujeto por lo demás idéntico pero no tratado. El término abarca perturbar y/o afectar una señal o respuesta nativa, por lo tanto, la mediación de una respuesta terapéutica beneficiosa en un sujeto, preferentemente, un ser humano.

20 Salvo que se especifique otra cosa, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

25 La expresión "unido operativamente" se refiere al enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que da como resultado la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. En general, las secuencias de ADN unidas operativamente están contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteína, están en el mismo marco de lectura.

30 El término antígeno tumoral "sobrexpresado" o "sobrexpresión" del antígeno tumoral está destinado a indicar un nivel anormal de expresión del antígeno tumoral en una célula de un área de enfermedad como un tumor sólido dentro de un tejido u órgano específico del paciente en relación con el nivel de expresión en una célula normal de ese tejido u órgano. Los pacientes que tienen tumores sólidos o una neoplasia hematológica caracterizada por la sobreexpresión del antígeno tumoral se pueden determinar mediante ensayos estándar conocidos en la técnica.

35 La administración "parenteral" de una composición inmunogénica incluye, por ejemplo, subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), inyección intramuscular (i.m.) o intraesternal, o técnicas de infusión.

40 Los términos "paciente", "sujeto", "individuo", y similares se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a cualquier animal, o células del mismo, *in vitro* o *in situ*, susceptibles de los métodos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones no limitantes, el paciente, sujeto o individuo es un ser humano.

45 El término "polinucleótido", como se usa en el presente documento, se define como una cadena de nucleótidos. Asimismo, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por lo tanto, los ácidos nucleicos y los polinucleótidos, como se usan en el presente documento, son intercambiables. Un experto en la técnica tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que se pueden hidrolizar en los "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos monoméricos se pueden hidrolizar en nucleósidos. Como se usa en el presente documento, los polinucleótidos incluyen, pero sin limitación, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen mediante cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo, sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico de una biblioteca recombinante o un genoma celular, la utilización de tecnología de clonación ordinaria y PCR™, y similares, y mediante medios sintéticos.

50 Tal como se usa en el presente documento, los términos "péptido", "polipéptido", y "proteína" se usan indistintamente y se refieren a un compuesto comprendido por restos de aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se limita el número máximo de aminoácidos que pueden comprender la secuencia de una proteína o péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término se refiere tanto a cadenas cortas, que también se denominan comúnmente en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, y a cadenas más largas, que generalmente se denominan en la técnica proteínas, de las cuales existen muchos tipos. Los "polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o una

combinación de los mismos.

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

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

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

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

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

Por la expresión "se une específicamente", como se usa en el presente documento con respecto a un anticuerpo, se entiende un anticuerpo que reconoce un antígeno específico, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas de una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una especie también puede unirse a ese antígeno de una o más especies. Pero, dicha reactividad entre especies no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En otro ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno también puede unirse a diferentes formas alélicas del antígeno. Sin embargo, dicha reactividad cruzada no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En algunos casos, las expresiones "unión específica" o "que se une específicamente", se pueden usar en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, para significar que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína específica en lugar de a proteínas en general. En caso de que un anticuerpo sea específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre, no marcado), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

Por el término "estimulación", se entiende una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora (por ejemplo, un complejo TCR/CD3) con su ligando afin mediando así un evento de transducción de señales, tales como, pero sin limitación, transducción de señal a través del complejo TCR/CD3. La estimulación puede mediar la expresión alterada de determinadas moléculas, tal como la disminución de TGF- $\beta$ , y/o la reorganización de las estructuras del citoesqueleto, y similares.

Una "molécula estimuladora", como se usa el término en el presente documento, significa una molécula en un linfocito T que se une específicamente con un ligando estimulante relacionado presente en una célula presentadora de antígeno.

Un "ligando estimulador", tal como se usa en el presente documento, significa un ligando que cuando está presente en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una aAPC, una célula dendrítica, un linfocito B y similares) se puede unir específicamente con un compañero de unión afin (referido en el presente documento como una "molécula estimuladora") en un linfocito T, mediando de este modo en una respuesta primaria mediante el linfocito T, incluyendo, pero sin limitación, activación, iniciación de una respuesta inmunitaria, proliferación y similares. Los ligandos estimuladores son bien conocidos en la técnica y comprenden, entre otros, una molécula del MHC de clase I cargada con un péptido, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo superagonista anti-CD28 y un anticuerpo superagonista anti-CD2.

El término "sujeto", "paciente" e "individuo" se usan indistintamente en el presente documento y pretenden incluir organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, mamíferos). Ejemplos de sujeto incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, una célula "sustancialmente purificada" es una célula que está esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que se ha separado de otros tipos de células con la que normalmente está asociada en su estado natural. En

algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, esta expresión se refiere simplemente a las células que se han separado de las células con las que están naturalmente asociadas en su estado natural. En algunas realizaciones, las células se cultivan *in vitro*. En otras realizaciones, las células no se cultivan *in vitro*.

5 El término "terapéutico", como se usa en el presente documento, significa un tratamiento y/o profilaxis. Se obtiene un efecto terapéutico mediante supresión, remisión o erradicación de un estado de enfermedad.

10 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del compuesto objeto que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema o sujeto que está buscando el investigador, veterinario, doctor en medicina u otro especialista clínico. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye que la cantidad de un compuesto que, cuando se administra, es suficiente para evitar el desarrollo de, o aliviar en cierta medida, uno o más de los signos o síntomas del trastorno o enfermedad que se está tratando. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad y la edad, el peso, etc., del sujeto que se va a tratar.

"Tratar" una enfermedad, como se usa el término en el presente documento, significa reducir la frecuencia o gravedad de al menos un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno experimentado por un sujeto.

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

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

30 Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que se puede usar para administrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica que incluyen, pero sin limitación, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. Por lo tanto, el término "vector" incluye un plásmido o un virus que se replica de forma autónoma. El término también debe interpretarse para incluir compuestos no plasmídicos y no víricos que faciliten la transferencia de ácido nucleico a las células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares. Los ejemplos de vectores víricos incluyen, pero sin limitación, vectores adenovíricos, vectores asociados con adenovirus, vectores víricos y similares.

40 Intervalos: a lo largo de esta divulgación, se pueden presentar diversos aspectos de la invención en un formato de intervalo. Debería entenderse que la descripción en formato de intervalo es únicamente por conveniencia y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la invención. Por consiguiente, debería considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los posibles subintervalos así como valores numéricos individuales en ese intervalo. Por ejemplo, debería considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 tiene subintervalos específicamente divulgados tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto es aplicable independientemente de la amplitud del intervalo.

## Descripción

50 La presente invención proporciona composiciones y su uso en métodos para tratar el cáncer, así como otras enfermedades. El cáncer puede ser una neoplasia hematológica, un tumor sólido, un tumor primario o metastásico. Otras enfermedades tratables usando las composiciones de la invención incluyen infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, así como enfermedades autoinmunes.

55 La invención proporciona una célula (por ejemplo, un linfocito Th 17) diseñada para expresar un CAR en donde el linfocito T con CAR presenta una propiedad antitumoral. El CAR de la invención se puede genomanipular para comprender un dominio extracelular que tiene un dominio de unión a antígeno fusionado a un dominio de señalización intracelular de la cadena zeta del complejo receptor de antígeno de linfocitos T (por ejemplo, CD3 zeta). El CAR de la invención cuando se expresa en un linfocito T es capaz de redirigir el reconocimiento de antígeno basado en la especificidad de unión al antígeno. Un antígeno ejemplar es la mesotelina porque este antígeno se expresa en una gran fracción de carcinomas. Sin embargo, la invención no se limita al direccionamiento de mesotelina. En cambio, la invención incluye cualquier dominio de unión a antígeno que cuando se une a su antígeno afín, afecta a una célula tumoral de modo que la célula tumoral deja de crecer, se le induce a morir o se ve afectada de otro modo para que la carga tumoral en un paciente disminuya o se elimine. El dominio de unión al antígeno se fusiona preferentemente con un dominio intracelular ICOS codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6 y una cadena zeta. Preferentemente, el dominio de unión al antígeno se fusiona con un dominio intracelular ICOS codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6 y uno o más dominios intracelulares

seleccionados del grupo de un dominio de señalización CD137 (4-1BB), un dominio de señalización de CD28, un dominio de señal de CD3zeta y cualquier combinación de los mismos.

5 El CAR de la invención comprende un dominio de señalización ICOS codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. Esto se debe a que la presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que las respuestas de linfocitos T mediadas por CAR de los linfocitos Th17 se pueden mejorar aún más con la adición de dominios coestimuladores. La inclusión del dominio de señalización ICOS aumenta significativamente la producción de IL-17, la actividad antitumoral, y la persistencia *in vivo* de los linfocitos Th17 que expresan CAR en comparación con un linfocito T con CAR que de otro modo sería idéntica y no está diseñado para expresar ICOS. De manera importante, la inclusión del dominio de señalización ICOS dentro del CAR también reduce significativamente la producción de IL-2. En una realización, la reducción y/o eliminación de la producción de IL-2 es beneficiosa ya que el CAR no desencadenaría la proliferación de linfocitos T reguladores.

15 En algunas realizaciones, la presente invención está dirigida a un vector retroviral o lentiviral que codifica un CAR que está integrado de manera estable en un linfocito Th17 y se expresa de manera estable en el mismo. En otras realizaciones, la presente invención está dirigida a un ARN que codifica el CAR que se transfecta en un linfocito Th17 y se expresa transitoriamente en el mismo. La expresión transitoria, no integrante de CAR en una célula mitiga las preocupaciones asociadas con la expresión permanente e integrada de CAR en una célula.

## 20 Composiciones

La presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio extracelular e intracelular. El dominio extracelular comprende un elemento de unión específico de diana, también denominado dominio de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el dominio extracelular también comprende un dominio de bisagra. El dominio intracelular o, de otro modo, el dominio citoplasmático comprende una región de señalización coestimuladora y una porción de cadena zeta. La región de señalización coestimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígeno o sus ligandos que se requieren para una respuesta eficaz de los linfocitos al antígeno.

30 Entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana del CAR, o entre el dominio citoplasmático y el dominio transmembrana del CAR, puede incorporarse un dominio espaciador. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "dominio espaciador" generalmente significa cualquier oligo o polipéptido que funciona para unir el dominio transmembrana a, tanto el dominio extracelular como, el dominio citoplasmático, en la cadena polipeptídica. Un dominio espaciador puede comprender hasta 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos y mucho más preferentemente de 25 a 50 aminoácidos.

40 La presente invención incluye construcciones de vectores retrovirales y lentivirales que expresan un CAR que se puede transducir directamente a una célula. La presente invención también incluye una construcción de ARN que se puede transfectar directamente en una célula. Un método para generar ARNm para su uso en la transfección implica la transcripción *in vitro* (*in vitro* Transcription, IVT) de una plantilla con cebadores especialmente diseñados, seguida de la adición de poliA, para producir una construcción que contiene la secuencia no traducida (Untranslated Region, "UTR") en 3' y 5', una caperuza en 5' y/o sitio interno de entrada al ribosoma (Internal Ribosome Entry Site, IRES), el gen que se va a expresar y una cola de PoliA, normalmente de 50 a 2000 bases de longitud. El ARN así producido puede transfectar eficazmente diferentes tipos de células. En una realización, el molde incluye secuencias para el CAR.

50 El CAR comprende un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático tal como se especifica en el presente documento. El dominio extracelular y el dominio transmembrana pueden proceder de cualquier fuente deseada de dichos dominios.

En algunos casos, el dominio de bisagra del CAR de la invención comprende el dominio de bisagra de CD8 $\alpha$ . En una realización, el dominio de bisagra CD8 comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4. En otra realización, el dominio de bisagra CD8 comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4.

### Dominio de unión a antígeno

60 En una realización, el CAR de la invención comprende un elemento de unión específico de diana, también denominado dominio de unión a antígeno. La elección de la fracción depende del tipo y el número de ligandos que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede elegirse para reconocer un ligando que actúa como un marcador de superficie celular en células diana asociadas con una patología particular. Así, los ejemplos de marcadores de la superficie celular que pueden actuar como ligandos para el dominio de la fracción de antígeno en el CAR de la invención incluyen aquellos asociados con infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, enfermedad autoinmunitaria y células cancerosas.

En una realización, el CAR de la invención se puede genomanipular para atacar un antígeno tumoral de interés mediante la genomanipulación de un dominio de unión a antígeno deseado que se una específicamente a un antígeno en una célula tumoral. En el ámbito de la presente invención, "antígeno tumoral" o "antígeno de trastorno hiperproliferativo" o "antígeno asociado con un trastorno hiperproliferativo", se refiere a antígenos que son comunes a trastornos hiperproliferativos específicos como el cáncer. Los antígenos discutidos en el presente documento se incluyen simplemente a modo de ejemplo. La lista no pretende ser exclusiva y más ejemplos serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

Los antígenos tumorales son proteínas producidas por células tumorales que provocan una respuesta inmunitaria, particularmente, respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T. La selección del dominio de unión a antígeno de la invención dependerá del tipo particular de cáncer a tratar. Los antígenos tumorales son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, un antígeno asociado a glioma, antígeno carcinoembrionario (CEA, por sus siglas en inglés), gonadotropina coriónica humana  $\beta$ , alfafetoproteína (AFP), AFP sensible a lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, transcriptasa inversa telomerasa humana, RU1, RU2 (AS), carboxilo esterasa intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostasa, antígeno prostático específico (PSA, por sus siglas en inglés), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, prosteína, PSMA, HER2/neu, survivina y telomerasa, antígeno 1 de tumor de carcinoma prostático (PCTA-1, por sus siglas en inglés), MAGE, ELF2M, elastasa de neutrófilos, ephrinB2, CD22, factor de crecimiento de insulina (Insulin Growth Factor, IGF)-I, IGF-II, receptor de IGF-I y mesotelina.

En una realización, el antígeno tumoral comprende uno o más epítomos antigénicos del cáncer asociados con un tumor maligno. Los tumores malignos expresan una cantidad de proteínas que pueden servir como antígenos diana para un ataque inmunitario. Estas moléculas incluyen, pero no se limitan a antígenos específicos de tejido tales como MART-1, tirosinasa y GP 100 en melanoma y fosfatasa ácida prostática (Prostatic Acid Phosphatase, PAP) y antígeno prostático específico (Prostate-Specific Antigen, PSA) en cáncer de próstata. Otras moléculas diana pertenecen al grupo de moléculas relacionadas con la transformación, tales como el oncogén HER-2/Neu/ErbB-2. Otro grupo de antígenos diana son los antígenos onco-fetales, tales como el antígeno carcinoembrionario (Carcinoembryonic Antigen, CEA). El linfoma de linfocitos B Tn, la inmunoglobulina idiotipo específica de tumor, constituye un antígeno de inmunoglobulina verdaderamente específico de tumor que es único para el tumor individual. Los antígenos de diferenciación de linfocitos B tales como CD19, CD20 y CD37 son otros candidatos para antígenos diana en el linfoma de linfocitos B. Algunos de estos antígenos (CEA, HER-2, CD19, CD20, idiotipo) se han utilizado como dianas para la inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales con éxito limitado.

El tipo de antígeno tumoral al que se hace referencia en la invención también puede ser un antígeno específico de tumor (Tumor-Specific Antigen, TSA) o un antígeno asociado a tumor (Tumor-Associated Antigen, TAA). Un TSA es exclusivo de células tumorales y no ocurre en otras células del cuerpo. Un antígeno asociado a TAA no es exclusivo de una célula tumoral y, en cambio, también se expresa en una célula normal en condiciones que no inducen un estado de tolerancia inmunológica al antígeno. La expresión del antígeno en el tumor puede ocurrir en condiciones que permiten que el sistema inmunitario responda al antígeno. Los TAA pueden ser antígenos que se expresan en células normales durante el desarrollo fetal cuando el sistema inmunitario es inmaduro e incapaz de responder o pueden ser antígenos que normalmente están presentes en niveles extremadamente bajos en células normales pero que se expresan en niveles mucho más altos en células tumorales.

Los ejemplos no limitantes de antígenos TSA o TAA incluyen los siguientes: Antígenos de diferenciación tales como MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2 y antígenos multilinaje específicos de tumor tales como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; antígenos embrionarios sobreexpresados tales como CEA; oncogenes sobreexpresados y genes supresores de tumores mutados tales como p53, Ras, HER-2/neu; antígenos tumorales únicos resultantes de translocaciones cromosómicas; tales como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; y antígenos víricos, tales como los antígenos del virus Epstein Barr (Epstein Barr virus antigens, EBVA) y los antígenos E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH). Otros antígenos grandes basados en proteínas incluyen TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-Ras, beta-Catenina, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteína, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\p1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, proteína de unión a TA-90\Mac-2\proteína asociada a la ciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP y TPS.

En una realización preferida, la porción del dominio de unión a antígeno de los CAR que se dirigen a un antígeno que incluye, pero sin limitación, CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, glucolípidos F77, EGFRvIII, GD-2, el TCR de MY-ESO-1, TCR de MAGE A3, y similares.

Dependiendo del antígeno deseado a ser dirigido, el CAR de la invención se puede genomanipular para incluir la fracción de unión a antígeno apropiada que sea específica para la diana de antígeno deseada. Por ejemplo, si la mesotelina es el antígeno deseado al que se va a dirigir, se puede usar un anticuerpo para mesotelina como el resto de unión a antígeno para su incorporación al CAR de la invención.

En una realización, la porción del dominio de unión a antígeno del CAR de la invención se dirige a la mesotelina.

Preferentemente, la porción del dominio de unión al antígeno en el CAR de la invención es el scFv SS1 que reconoce la mesotelina humana, en donde la secuencia de ácido nucleico del scFv SS1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3. En otra realización, la porción scFv SS1 del CAR de la invención comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 3.

5 Dominio transmembrana

Con respecto al dominio transmembrana, el CAR se puede diseñar para que comprenda un dominio transmembrana que se fusiona con el dominio extracelular del CAR. En una realización, se utiliza el dominio transmembrana que se asocia de forma natural a uno de los dominios en el CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana se puede seleccionar o modificar mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana superficial para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

15 El dominio transmembrana puede provenir de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede provenir de cualquier proteína unida a membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana de uso particular en la presente invención pueden provenir de (es decir, comprender al menos la(s) región(es) transmembrana de la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, ICOS. Como alternativa, el dominio transmembrana puede ser sintético, en cuyo caso comprenderá restos predominantemente hidrófobos tales como leucina y valina. Preferentemente un triplete de fenilalanina, triptófano y valina se encontrará en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. Opcionalmente, un enlazador corto de oligopéptido o polipéptido, preferentemente entre 2 y 10 aminoácidos de longitud puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplasmática del CAR. Un doblete de glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado.

25 Preferentemente, el dominio transmembrana en el CAR de la invención comprende el dominio transmembrana ICOS. En una realización, el dominio transmembrana ICOS comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 5. En otra realización, el dominio transmembrana ICOS comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 5.

#### Dominio citoplasmático

35 El dominio citoplasmático o, de lo contrario, el dominio de señalización intracelular del CAR de la invención es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se ha colocado el CAR. El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de un linfocito T, por ejemplo, puede ser la actividad citolítica o la actividad colaboradora, incluida la secreción de citocinas. Por lo tanto, la expresión "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula a realizar una función especializada. Si bien generalmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario utilizar toda la cadena. En la medida en que se use una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada se puede usar en lugar de la cadena intacta siempre que transduzca la señal de la función efectora. Por lo tanto, el término dominio de señalización intracelular está destinado a incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de función efectora. De acuerdo con la invención, el dominio de señalización intracelular comprendido en el CAR es al menos un dominio intracelular ICOS codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6.

50 Los ejemplos preferidos de dominios de señalización intracelular para su uso en el CAR de la invención incluyen las secuencias citoplasmáticas del receptor de linfocitos T (TCR) y los co-receptores que actúan en concierto para iniciar la transducción de señales después de la activación del receptor de antígeno, así como cualquier derivada o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

Se sabe que las señales generadas a través del TCR solo son insuficientes para la activación total del linfocito T y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por lo tanto, se puede decir que la activación de los linfocitos T está mediada por dos clases distintas de secuencia de señalización citoplasmática: los que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmáticas primarias) y los que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmáticas secundarias).

60 Las secuencias de señalización citoplasmática primaria regulan la activación primaria del complejo TCR, ya sea de forma estimulante o inhibitoria. Las secuencias de señalización citoplasmática primaria que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina inmunorreceptores o ITAM.

65 Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que son de uso particular en la invención incluyen los derivados de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon,

CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. Se prefiere particularmente que la molécula de señalización citoplasmática en el CAR de la invención comprenda una secuencia de señalización citoplasmática derivada de CD3 zeta.

5 En una realización preferida, el dominio citoplasmático del CAR como se especifica en el presente documento se puede diseñar para que comprenda el dominio de señalización CD3-zeta combinado con cualquier otro dominio citoplasmático deseado útil en el contexto del CAR de la invención. Por ejemplo, el dominio citoplasmático del CAR puede comprender una porción de cadena CD3-zeta y una región de señalización coestimuladora. La región de señalización coestimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de superficie celular que no sea un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta de linfocitos eficaz hacia un antígeno. Tal como se menciona en el presente documento, el dominio de señalización intracelular del CAR de la invención está al menos codificado por ICOS por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. Los ejemplos de tales moléculas adicionales que pueden estar comprendidas incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (Lymphocyte Function-Associated Antigen-1, LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente con CD83 y similares. Por lo tanto, mientras que la invención comprende ICOS codificados por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6 tal como el elemento de señalización coestimuladora, otros elementos coestimuladores adicionales están dentro del alcance de la invención.

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

25 En una realización, el dominio citoplasmático está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de ICOS codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En otra realización, el dominio citoplasmático tal como se especifica en el presente documento está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. En otra realización más, el dominio citoplasmático tal como se especifica en el presente documento está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de ICOS y 4-1BB.

35 En una realización, el dominio citoplasmático en el CAR de la invención está diseñado para comprender el dominio de señalización de ICOS y el dominio de señalización de CD3-zeta, en donde el dominio de señalización de ICOS comprende la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 6 y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 7.

40 En una realización, el dominio citoplasmático en el CAR de la invención está diseñado para comprender el dominio de señalización de ICOS y el dominio de señalización de CD3-zeta, en donde el dominio de señalización de ICOS comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 6 y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 7.

#### Vectores

45 La presente invención abarca una construcción de ADN que comprende secuencias de un CAR, en donde la secuencia comprende la secuencia de ácido nucleico de un dominio de unión a antígeno unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico de un dominio intracelular ICOS codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En algunos casos, el CAR puede comprender ICOS codificados por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6 y cualquier combinación de CD3-zeta, CD28, 4-1BB, y similares.

50 En una realización, el CAR de la invención comprende scFv anti-mesotelina (por ejemplo, scFv SS1), bisagra CD8 de humano, dominio transmembrana ICOS e ICOS humano codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 6 y dominios de señalización CD3zeta. En una realización, el CAR de la invención comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 8. En otra realización, el CAR de la invención comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 8.

60 Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas deseadas se pueden obtener utilizando métodos recombinantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, seleccionando bibliotecas de células que expresan el gen, obteniendo el gen de un vector que se sabe que incluye el mismo, o aislando directamente de células y tejidos que lo contienen, utilizando técnicas convencionales. Como alternativa, el gen de interés se puede producir de manera sintética, en lugar de clonado.

65 La presente invención también proporciona vectores en los que se inserta un ADN de la presente invención. Los vectores que provienen de retrovirus tales como el lentivirus son herramientas adecuadas para lograr la transferencia génica a largo plazo, ya que permiten a largo plazo, la integración estable de un transgén y su propagación en células hijas. Los vectores lentivíricos tienen la ventaja añadida sobre los vectores derivados de

onco-retrovirus, tales como los virus de la leucemia murina, en que pueden transducir células no proliferativas, tales como los hepatocitos. También tienen la ventaja añadida de baja inmunogenicidad.

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

Las construcciones de expresión de la presente invención también se pueden usar para la inmunización de ácido nucleico y la terapia génica, utilizando protocolos estándar de administración de genes. Los métodos para la administración de genes son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las Pat. de EE.UU. N.º 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466. En otra realización, la invención proporciona un vector de terapia génica.

El ácido nucleico se puede clonar en varios tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede clonar en un vector que incluye, pero sin limitación, un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido. Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación.

Además, el vector de expresión se puede proporcionar a una célula en forma de un vector vírico. La tecnología de vectores víricos es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus, que son útiles como vectores incluyen, pero sin limitación, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios convenientes de endonucleasa de restricción, y uno o más marcadores seleccionables, (por ejemplo, los documentos WO 01/96584; WO 01/29058; y la patente de EE.UU. N.º 6.326.193).

Se han desarrollado varios sistemas basados en virus para la transferencia de genes a células de mamíferos. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de administración de genes. Un gen seleccionado se puede insertar en un vector y se puede empaquetar en partículas retrovíricas usando técnicas conocidas en la materia. El virus recombinante se puede aislar y administrar a las células del sujeto *in vivo* o *ex vivo*. Se conocen varios sistemas retrovíricos en la técnica. En algunas realizaciones, se usan vectores de adenovirus. Se conocen varios vectores de adenovirus en la técnica. En una realización, se utilizan vectores de lentivirus.

Los elementos promotores adicionales, por ejemplo, potenciadores, regular la frecuencia de iniciación transcripcional. Típicamente, estos se encuentran en la región de 30-110 pb aguas arriba del sitio de inicio, aunque recientemente se ha demostrado que varios promotores contienen elementos funcionales aguas abajo del sitio de inicio también. El espaciado entre los elementos promotores con frecuencia es flexible, de modo que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven uno con respecto al otro. En el promotor de timidina quinasa (tk), el espaciado entre los elementos promotores se puede aumentar a 50 pb de separación antes de que la actividad comience a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de manera cooperativa o independiente para activar la transcripción.

Un ejemplo de un promotor adecuado es la secuencia del promotor de citomegalovirus (CMV) temprano inmediato. Esta secuencia del promotor es una secuencia del promotor constitutiva fuerte capaz de dirigir altos niveles de expresión de cualquier secuencia polinucleotídica unida operativamente a la misma. Otro ejemplo de un promotor adecuado es el factor de crecimiento de elongación - 1 $\alpha$  (Elongation Growth Factor-1 $\alpha$ , EF-1 $\alpha$ ). Sin embargo, también se pueden usar otras secuencias promotoras constitutivas, incluyendo, pero no limitado al promotor temprano del virus del simio 40 (SV40), virus de tumor mamario de ratón (Mouse Mammary Tumor Virus, MMTV), promotor de repetición terminal larga (Long Term Repeat, LTR) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), promotor MoMuLV, un promotor del virus de la leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos tales como, pero sin limitación, el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina quinasa. Además, la invención no debe limitarse al uso de promotores constitutivos. Los promotores inducibles también se contemplan como parte de la invención. El uso de un promotor inducible proporciona un interruptor molecular capaz de activar la expresión de la secuencia de polinucleótidos que está unida operativamente cuando se desea dicha expresión, o inactivar la expresión cuando no se desea la expresión. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina.

Para evaluar la expresión de un polipéptido CAR o porciones del mismo, el vector de expresión que se introducirá en una célula también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen indicador o ambos para facilitar la identificación y selección de células que expresan de la población de células que se busca transfectar o infectar a través de vectores víricos. En otros aspectos, el marcador seleccionable se puede transportar en una pieza

separada de ADN y se puede usar en un procedimiento de cotransfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes indicadores pueden estar flanqueados con secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células hospedadoras. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tales como neo y similares.

5 Los genes indicadores se usan para identificar células potencialmente transfectadas y para evaluar la funcionalidad de las secuencias reguladoras. En general, un gen indicador es un gen que no está presente o expresado por el organismo o tejido receptor y que codifica un polipéptido cuya expresión se manifiesta por alguna propiedad fácilmente detectable, por ejemplo, actividad enzimática. La expresión del gen indicador se analiza en un momento  
10 adecuado después de que el ADN se haya introducido en las células receptoras. Los genes indicadores adecuados pueden incluir genes que codifican la luciferasa, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa, fosfatasa alcalina secretada, o el gen de la proteína verde fluorescente (por ejemplo., Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Los sistemas de expresión adecuados son bien conocidos y se pueden preparar usando técnicas conocidas o se pueden obtener comercialmente. En general, la construcción con la mínima región flanqueante en 5' que muestra  
15 el nivel de expresión más alto del gen indicador se identifica como el promotor. Dichas regiones promotoras pueden estar vinculadas a un gen indicador y se pueden usar para evaluar la capacidad de los agentes de modular la transcripción impulsada por el promotor.

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

25 Los métodos físicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación, y similares. Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Un método preferido para la introducción de un polinucleótido en una célula hospedadora es la transfección con fosfato de calcio.  
30

Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula hospedadora incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores víricos, y especialmente los vectores retrovíricos, se han convertido en el método más utilizado para insertar genes en células de mamíferos, por ejemplo, humanas. Otros vectores víricos pueden provenir de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adenoasociados, y similares.  
35 Véase, por ejemplo, las Pat. de EE.UU. N.º 5.350.674 y 5.585.362.

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

En el caso en el que se utiliza un sistema de entrega no vírica, un vehículo de administración ejemplar es un liposoma. Se contempla el uso de formulaciones lipídicas para la introducción de los ácidos nucleicos en una célula hospedadora (*in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*). En otro aspecto, el ácido nucleico puede estar asociado con un lípido. El ácido nucleico asociado con un lípido se puede estar encapsulado en el interior acuoso de un liposoma, intercalado dentro de la bicapa lipídica de un liposoma, unido a un liposoma a través de una molécula de enlace que está asociada tanto con el liposoma como con el oligonucleótido, atrapado en un liposoma, formando un complejo con un liposoma, disperso en una solución que contiene un lípido, mezclado con un lípido, combinado con un lípido, contenido como una suspensión en un lípido, contenido o formando un complejo con una micela, o asociado con un lípido. Las composiciones asociadas a lípidos, lípidos/ADN o lípidos/vectores de expresión no están limitadas a ninguna estructura particular en solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura de bicapa, tal como micelas, o con una estructura "colapsada". También pueden simplemente intercalarse en una solución, posiblemente formando agregados que no son uniformes en tamaño o forma. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser  
50 lípidos naturales o sintéticos. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotas de grasa que se dan de manera natural en el citoplasma, así como la clase de compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, tales como los ácidos grasos, alcoholes, aminas, aminoalcoholes y aldehídos.

Los lípidos adecuados para su uso se pueden obtener de fuentes comerciales. Por ejemplo, la dimiristil fosfatidilcolina ("DMPC") se puede obtener de Sigma, St. Louis, MO; el fosfato de dicetilo ("DCP") se puede obtener de K & K Laboratories (Plainview, NY); el colesterol ("Choi") se puede obtener de Calbiochem-Behring; el dimiristilfosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos se pueden obtener de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). Las soluciones de reserva de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol se pueden almacenar a aproximadamente -20 °C. El cloroformo se usa como el único disolvente ya que se evapora más fácilmente que el metanol. "Liposoma" es un término genérico que abarca una variedad de vehículos lipídicos simples y multilamelares formados por la generación de bicapas o agregados lipídicos cerrados. Los liposomas se pueden caracterizar por tener estructuras  
60

vesiculares con una membrana de bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por medio acuoso. Se forman de manera espontánea cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos se reorganizan antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). Sin embargo, también se incluyen composiciones que tienen diferentes estructuras en solución que la estructura vesicular normal. Por ejemplo, los lípidos pueden asumir una estructura micelar o simplemente existir como agregados no uniformes de moléculas de lípidos. También se contemplan los complejos de lipofectamina-ácido nucleico.

Independientemente del método utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula hospedadora o exponer una célula al inhibidor de la presente invención, para confirmar la presencia de la secuencia de ADN recombinante en la célula hospedadora, se pueden realizar una variedad de ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos "biológicos moleculares" bien conocidos por los expertos en la materia, tales como los análisis por transferencia de Southern y de Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", tales como detectar la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y análisis por transferencia de Western) o por ensayos descritos en el presente documento para identificar agentes que están dentro del alcance de la invención.

#### Transfección de ARN

En una realización, los linfocitos T genéticamente modificados de la invención se modifican mediante la introducción de ARN. En una realización, CAR de ARN transcrito *in vitro* se puede introducir en una célula como una forma de transfección transitoria. El ARN es producido por transcripción *in vitro* usando un molde generado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN de interés de cualquier fuente se puede convertir directamente por PCR en un molde para la síntesis de ARNm *in vitro* usando cebadores apropiados y ARN polimerasa. La fuente del ADN puede ser, por ejemplo, ADN genómico, ADN plasmídico, ADN de fago, ADNc, secuencia de ADN sintético o cualquier otra fuente apropiada de ADN. El molde deseado para la transcripción *in vitro* es el CAR de la presente invención. Por ejemplo, el molde para el ARN del CAR comprende un dominio extracelular que comprende un dominio variable de cadena sencilla de un anticuerpo antitumoral; un dominio transmembrana que comprende la bisagra y el dominio transmembrana de CD8a; y un dominio citoplasmático comprende el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de ICOS.

En una realización, el ADN que se utilizará para la PCR contiene un marco de lectura abierto. El ADN puede ser de una secuencia de ADN natural del genoma de un organismo. En una realización, el ADN es un gen de longitud completa de interés de una porción de un gen. El gen puede incluir algunas o todas las regiones no traducidas (UTR) de 5' y/o 3'. El gen puede incluir exones e intrones. En una realización, el ADN que se utilizará para la PCR es un gen humano. En otra realización, el ADN que se utilizará para la PCR es un gen humano que incluye las UTR 5' y 3'. El ADN puede ser de manera alternativa una secuencia de ADN artificial que normalmente no se expresa en un organismo natural. Una secuencia de ADN artificial ejemplar es aquella que contiene porciones de genes que se unen para formar un marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión. Las porciones de ADN que están ligadas juntas pueden ser de un solo organismo o de más de un organismo.

Los genes que se pueden usar como fuentes de ADN para PCR incluyen genes que codifican polipéptidos que proporcionan un efecto terapéutico o profiláctico a un organismo o que se pueden usar para diagnosticar una enfermedad o trastorno en un organismo. Los genes preferidos son genes que son útiles para un tratamiento a corto plazo, o cuando existen problemas de seguridad con respecto a la dosis o el gen expresado. Por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, trastornos autoinmunitarios, infecciones por parásitos, víricas, bacterianas, fúngicas u otras, el(los) transgén(es) que se expresará(n) pueden codificar un polipéptido que funciona como un ligando o receptor para las células del sistema inmunitario, o puede funcionar para estimular o inhibir el sistema inmunitario de un organismo. En algunas realizaciones, no es deseable tener una estimulación continua y prolongada del sistema inmunitario, ni es necesario producir cambios que duren después de un tratamiento exitoso, ya que esto puede provocar un nuevo problema. Para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario, puede ser deseable inhibir o suprimir el sistema inmunitario durante un brote, pero no a largo plazo, lo que podría provocar que el paciente se vuelva demasiado sensible a una infección.

La PCR se utiliza para generar un molde para la transcripción *in vitro* del ARNm que se utiliza para la transfección. Los métodos para realizar la PCR son bien conocidos en la técnica. Los cebadores para su uso en la PCR están diseñados para tener regiones que son sustancialmente complementarias a las regiones del ADN que se utilizará como molde para la PCR. "Sustancialmente complementario", tal como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de nucleótidos donde la mayoría o todas las bases en la secuencia del cebador son complementarias, o una o más bases no son complementarias o no coinciden. Las secuencias sustancialmente complementarias pueden hibridar o hibridarse con la diana ADN pensada en condiciones de hibridación usadas para la PCR. Los cebadores pueden estar diseñados para ser sustancialmente complementarios a cualquier parte del molde de ADN. Por ejemplo, los cebadores se pueden diseñar para amplificar la porción de un gen que normalmente se transcribe en las células (el marco de lectura abierto), incluyendo 5' y 3' UTR. Los cebadores también se pueden diseñar para amplificar una porción de un gen que codifica un dominio particular de interés. En una realización, los cebadores

están diseñados para amplificar la región codificante de un ADNc humano, incluyendo todas o partes de las 5' y 3' UTR. Los cebadores útiles para PCR se generan mediante métodos sintéticos que son bien conocidos en la técnica. Los "cebadores directos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a los nucleótidos en el molde de ADN que están aguas arriba de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Aguas arriba" se utiliza en el presente documento para referirse a una ubicación 5' de la secuencia de ADN que se va a amplificar en relación con la cadena de codificación. Los "cebadores inversos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a un molde de ADN bicatenario que se encuentra aguas abajo de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Aguas abajo" se usa en el presente documento para referirse a una ubicación 3' de la secuencia de ADN que se va a amplificar en relación con la cadena de codificación.

Cualquier ADN polimerasa útil para PCR se puede usar en los métodos desvelados en el presente documento. Los reactivos y la polimerasa están disponibles comercialmente de varias fuentes.

También se pueden usar estructuras químicas con la capacidad de promover la estabilidad y/o la eficacia de la traducción. El ARN tiene preferentemente 5' y 3' UTR. En una realización, la 5' UTR tiene entre cero y 3000 nucleótidos de longitud. La longitud de las secuencias 5' y 3' UTR que se añadirán a la región codificante se puede alterar mediante diferentes métodos, incluyendo, pero sin limitación, diseñar cebadores para PCR que hibridan con diferentes regiones de las UTR. Usando este enfoque, un experto en la materia puede modificar las longitudes de 5' y 3' UTR requeridas para lograr una eficacia de traducción óptima después de la transfección del ARN transcrito.

Las 5' y 3' UTR pueden ser las que se dan de forma natural, las 5' y 3' UTR endógenas para el gen de interés. Como alternativa, las secuencias UTR que no son endógenas al gen de interés se pueden añadir incorporando las secuencias UTR en los cebadores directo e inverso o mediante cualquier otra modificación del molde. El uso de secuencias UTR que no son endógenas para el gen de interés puede ser útil para modificar la estabilidad y/o la eficacia de traducción del ARN. Por ejemplo, se sabe que los elementos ricos en AU en secuencias 3' UTR pueden reducir la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, las 3' UTR se pueden seleccionar o diseñar para aumentar la estabilidad del ARN transcrito en función de las propiedades de las UTR que son bien conocidas en la técnica.

En una realización, la 5' UTR puede contener la secuencia Kozak del gen endógeno. Como alternativa, cuando la PCR añade una 5' UTR que no es endógena al gen de interés como se describió anteriormente, se puede rediseñar una secuencia de Kozak consensuada añadiendo la secuencia 5' UTR. Las secuencias de Kozak pueden aumentar la eficacia de la traducción de algunas transcripciones de ARN, pero no parece ser necesario para todos los ARN para permitir una traducción eficaz. La necesidad de las secuencias de Kozak para muchos ARNm es conocido en la técnica. En otras realizaciones, la 5' UTR puede provenir de un virus de ARN cuyo genoma de ARN es estable en las células. En otras realizaciones, se pueden usar diversos análogos de nucleótidos en las 3' o 5' UTR para impedir la degradación por exonucleasa del ARNm.

Para permitir la síntesis de ARN a partir de un molde de ADN sin la necesidad de clonar genes, un promotor de transcripción debe estar unido al molde de ADN aguas arriba de la secuencia a transcribir. Cuando se añade una secuencia que funciona como un promotor para una ARN polimerasa al extremo 5' del cebador directo, el promotor de la ARN polimerasa se incorpora al producto de PCR aguas arriba del marco de lectura abierto que se va a transcribir. En una realización preferida, el promotor es un promotor de polimerasa T7, tal como se describe en otra parte del presente documento. Otros promotores útiles incluyen, pero sin limitación, los promotores de ARN polimerasa T3 y SP6. Las secuencias de consenso de nucleótidos para los promotores T7, T3 y SP6 se conocen en la técnica.

En una realización preferida, el ARNm tiene una tapa en el extremo 5' y una cola de poli(A) en 3' que determina la unión al ribosoma, el comienzo de la traducción y la estabilidad del ARNm en la célula. En un molde de ADN circular, por ejemplo, ADN plasmídico, la ARN polimerasa produce un producto concatamérico largo que no es adecuado para la expresión en células eucariotas. La transcripción del ADN plasmídico linealizado al final de la 3' UTR da como resultado un ARNm de tamaño normal que no es eficaz en la transfección eucariota, incluso si se poliadenila después de la transcripción.

En un molde de ADN lineal, la ARN polimerasa del fago T7 puede prolongar el extremo 3' de la transcripción más allá de la última base del molde (Schenborn y Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva y Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003).

El método convencional de integración de estiramientos de poliA/T en un molde de ADN es la clonación molecular. Sin embargo, la secuencia de poliA/T integrada en el ADN plasmídico puede causar inestabilidad plasmídica, es por eso que los moldes de ADN plasmídico obtenidos de células bacterianas a menudo están altamente contaminados con deleciones y otras anomalías. Esto hace que los procedimientos de clonación no solo sean laboriosos y lentos, sino que a menudo no sean fiables. Es por eso que un método que permite la construcción de moldes de ADN con estiramientos de 3' poliA/T sin clonación es altamente deseable.

El segmento de poliA/T del molde de ADN transcripcional se puede producir durante la PCR mediante el uso de un

5 cebador inverso que contiene una cola de poli(T), tal como la cola de 100T (el tamaño puede ser 50-5000 T), o después de la PCR por cualquier otro método, incluyendo, pero sin limitación, ligadura de ADN o recombinación *in vitro*. Las colas de poli(A) también proporcionan estabilidad a los ARN y reducen su degradación. En general, la longitud de una cola de poli(A) se correlaciona positivamente con la estabilidad del ARN transcrito. En una realización, la cola de poli(A) tiene entre 100 y 5000 adenosinas.

10 Las colas de poli(A) de los ARN pueden prolongarse aún más después de la transcripción *in vitro* con el uso de una poli(A) polimerasa, tal como poliA polimerasa de *E. coli* (E-PAP). En una realización, aumentar la longitud de una cola de poli(A) de 100 nucleótidos a entre 300 y 400 nucleótidos da como resultado un aumento de aproximadamente el doble en la eficacia de traducción del ARN. Además, la unión de diferentes grupos químicos al extremo 3' puede aumentar la estabilidad del ARNm. Tal fijación puede contener nucleótidos modificados/artificiales, aptámeros y otros compuestos. Por ejemplo, los análogos de ATP se pueden incorporar en la cola de poli(A) utilizando la poli(A) polimerasa.

15 Los análogos de ATP pueden aumentar aún más la estabilidad del ARN.

20 Las tapas de 5' también proporcionan estabilidad a las moléculas de ARN. En una realización preferida, los ARN producidos por los métodos desvelados en el presente documento incluyen una tapa de 5'. La tapa 5' se proporciona usando técnicas conocidas en la materia y descritas en el presente documento (Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., ARN, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

25 Los ARN producidos por los métodos desvelados en el presente documento también pueden contener una secuencia de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). La secuencia IRES puede ser cualquier secuencia vírica, cromosómica o artificialmente diseñada que inicia la unión del ribosoma independiente de la tapa al ARNm y facilita el inicio de la traducción. Se puede incluir cualquier soluto adecuado para la electroporación celular, que puede contener factores que facilitan la permeabilidad y la viabilidad celular, tales como los azúcares, péptidos, lípidos, proteínas, antioxidantes y tensioactivos.

30 El ARN se puede introducir en las células diana utilizando cualquiera de varios métodos diferentes, por ejemplo, métodos disponibles comercialmente que incluyen, pero sin limitación, electroporación (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Colonia, Alemania)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) o el Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), transfección mediada por liposomas catiónicos mediante lipofección, encapsulación de polímeros, transfección mediada por péptidos, o sistemas de administración de partículas biolísticas tales como "pistolas de genes" (véase, por ejemplo, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)).

#### Linfocitos T genéticamente modificados

40 En algunas realizaciones, las secuencias CAR se administran a las células usando un vector retrovívico o lentivívico. Los vectores retrovívicos y lentivívicos que expresan CAR se pueden administrar en diferentes tipos de células eucariotas, así como en tejidos y organismos completos utilizando células transducidas como vehículo o suministro local o sistémico sin células de vectores encapsulados, unidos o desnudos. El método utilizado puede ser para cualquier propósito donde se requiera o sea suficiente una expresión estable.

45 En otras realizaciones, las secuencias de CAR se administran en las células usando ARNm transcrito *in vitro*. El ARNm transcrito *in vitro* se puede administrar a diferentes tipos de células eucariotas, así como a tejidos y organismos completos utilizando células transfectadas como vehículo o suministro local o sistémico sin células de ARNm encapsulado, unido o desnudo. El método utilizado puede ser para cualquier propósito donde la expresión transitoria sea necesaria o suficiente.

50 Los métodos desvelados se pueden aplicar a la modulación de la actividad de los linfocitos T en la investigación básica y la terapia, en los campos del cáncer, células madre, infecciones agudas y crónicas, y enfermedades autoinmunes, incluida la evaluación de la capacidad de los linfocitos T genéticamente modificados para eliminar una célula cancerosa diana.

55 Los métodos también proporcionan la capacidad de controlar el nivel de expresión en un amplio intervalo cambiando, por ejemplo, el promotor o la cantidad de ARN de entrada, haciendo posible regular individualmente el nivel de expresión. Asimismo, la técnica de la producción de ARNm basada en la PCR facilita enormemente el diseño de los ARNm del receptor quimérico con diferentes estructuras y la combinación de sus dominios. Por ejemplo, la variación de diferentes dominios efectores/coestimuladores intracelulares en múltiples receptores quiméricos en la misma célula permite la determinación de la estructura de las combinaciones de receptores que evalúan el nivel más alto de citotoxicidad contra múltiples dianas antigénicas y, al mismo tiempo, la citotoxicidad más baja hacia las células normales.

65 Una ventaja de los métodos de transfección de ARN de la invención es que la transfección de ARN es esencialmente transitoria y sin vectores: Un transgén de ARN se puede administrar a un linfocito y se puede

expresar en él después de una breve activación celular *in vitro*, como un casete de expresión mínimo sin la necesidad de secuencias víricas adicionales. En estas condiciones, la integración del transgén en el genoma de la célula huésped es improbable. La clonación de células no es necesaria debido a la eficacia de la transfección del ARN y a su capacidad para modificar uniformemente toda la población de linfocitos.

La modificación genética de linfocitos T con ARN transcrito *in vitro* (IVT-ARN) utiliza dos estrategias diferentes, las cuales han sido probadas sucesivamente en varios modelos animales. Las células se transfectan con ARN transcrito *in vitro* mediante lipofección o electroporación. Preferentemente, es deseable estabilizar el IVT-ARN utilizando diversas modificaciones para lograr una expresión prolongada del IVT-ARN transferido.

Algunos vectores IVT son conocidos en la literatura que se utilizan de manera estandarizada como molde para la transcripción *in vitro* y que se han modificado genéticamente de tal manera que se producen transcripciones de ARN estabilizadas. Actualmente, los protocolos utilizados en la técnica se basan en un vector plasmídico con la siguiente estructura: un promotor de ARN polimerasa 5' que permite la transcripción de ARN, seguido de un gen de interés que está flanqueado en 3' y/o 5' por regiones no traducidas (UTR), y un casete de poliadenilo 3' que contiene nucleótidos 50-70 A. Antes de la transcripción *in vitro*, el plásmido circular se linealiza aguas abajo del casete de poliadenilo mediante enzimas de restricción de tipo II (la secuencia de reconocimiento se corresponde con el sitio de escisión). El casete de poliadenilo se corresponde, por lo tanto, con la secuencia posterior de poli(A) en el transcrito. Como resultado de este procedimiento, algunos nucleótidos permanecen como parte del sitio de escisión enzimática después de la linealización y extienden o enmascaran la secuencia de poli(A) en el extremo 3'. No está claro, si esta proyección no fisiológica afecta a la cantidad de proteína producida intracelularmente a partir de tal construcción.

El ARN tiene varias ventajas sobre las estrategias víricas o plasmídicas más tradicionales. La expresión génica de una fuente de ARN no requiere transcripción y el producto proteico se produce rápidamente después de la transfección. Además, dado que el ARN solo tiene que acceder al citoplasma, en lugar del núcleo y, por lo tanto, los métodos de transfección típicos dan como resultado una tasa de transfección extremadamente alta. Además, las estrategias basadas en plásmidos requieren que el promotor que dirige la expresión del gen de interés esté activo en las células en estudio.

En otro aspecto, la construcción de ARN se puede administrar a las células por electroporación. Véase, por ejemplo, las formulaciones y la metodología de electroporación de construcciones de ácido nucleico en células de mamíferos tal como se enseña en los documentos US 2004/0014645, US 2005/0052630A1, US 2005/0070841A1, US 2004/0059285A1, US 2004/0092907A1. Los diversos parámetros que incluyen la intensidad del campo eléctrico requerida para la electroporación de cualquier tipo de célula conocida se conocen generalmente en la bibliografía de investigación relevante, así como en numerosas patentes y aplicaciones en el campo. Véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. N.º 6.678.556, la Pat. de EE.UU. N.º 7.171.264, y la Pat. de EE.UU. N.º 7.173.116.

Los equipos para la aplicación terapéutica de electroporación están disponibles comercialmente, por ejemplo, el sistema de terapia de electroporación de ADN MedPulser™ (Inovio/Genetronics, San Diego, California), y se describen en patentes tales como la Pat. de EE.UU. N.º 6.567.694; la Pat. de EE.UU. N.º 6.516.223, la Pat. de EE.UU. N.º 5.993.434, la Pat. de EE.UU. N.º 6.181.964, la Pat. de EE.UU. N.º 6.241.701, y la patente de EE.UU. N.º 6.233.482; la electroporación también se puede usar para la transfección de células *in vitro* tal como se describe, por ejemplo, en el documento US20070128708A1. La electroporación también se puede utilizar para suministrar ácidos nucleicos a las células *in vitro*. Por consiguiente, la administración mediada por electroporación en células de ácidos nucleicos, incluidas las construcciones de expresión que utilizan cualquiera de los muchos dispositivos disponibles y sistemas de electroporación conocidos por los expertos en la materia, presenta un nuevo y emocionante medio para suministrar un ARN de interés a una célula diana.

#### Fuentes de linfocitos T

Antes de la expansión, se obtiene una fuente de linfocitos T de un sujeto. Ejemplos de sujeto incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos. Preferentemente, el sujeto es un ser humano. Los linfocitos T se pueden obtener de varias fuentes, que incluyen células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de nódulos linfáticos, tejido del bazo y tumores. En determinadas realizaciones de la presente invención, se puede usar cualquier cantidad de líneas de linfocitos T disponibles en la técnica. En determinadas realizaciones de la presente invención, los linfocitos T se pueden obtener de una unidad de sangre recogida de un sujeto utilizando cualquier cantidad de técnicas conocidas por el experto en la materia, tales como la separación de ficoll. En una realización preferida, las células de la sangre en circulación de un individuo se obtienen por aféresis o leucaféresis. El producto de aféresis típicamente contiene linfocitos, incluyendo linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En una realización, las células recogidas por aféresis se pueden lavar para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio apropiado para las etapas de procesamiento posteriores. En una realización de la invención, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En una realización alternativa, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no todos, los cationes divalentes. Tras el lavado, las células se pueden resuspender en una variedad de tampones biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS sin Ca y sin Mg. Como alternativa, los componentes indeseables de la muestra de aféresis

se pueden eliminar y las células se resuspenden directamente en medios de cultivo.

En otra realización, los linfocitos T se aíslan de la sangre periférica lisando los glóbulos rojos y agotando los monocitos, por ejemplo, por centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™. Como alternativa, los linfocitos T se pueden aislar del cordón umbilical. En cualquier caso, una subpoblación específica de linfocitos T se puede aislar adicionalmente mediante técnicas de selección positivas o negativas.

El enriquecimiento de una población de linfocitos T por selección negativa se puede lograr usando una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente. Un método preferido es la clasificación y/o selección celular mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza una mezcla de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4+ por selección negativa, una mezcla de anticuerpos monoclonales normalmente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8.

Para el aislamiento de una población de células deseada mediante selección positiva o negativa, la concentración de células y superficie (por ejemplo, partículas tales como perlas) puede variar. En determinadas realizaciones, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las perlas y las células (es decir, aumentar la concentración de células), para garantizar el máximo contacto de células y perlas. Por ejemplo, en una realización, se utiliza una concentración de 2 mil millones de células/ml. En una realización, se utiliza una concentración de 1 mil millones de células/ml. En una realización adicional, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En una realización adicional, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En otra realización más, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En realizaciones adicionales, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml.

El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un mayor rendimiento celular, activación celular y expansión celular.

En una realización relacionada, puede ser deseable utilizar concentraciones más bajas de células. Al diluir significativamente la mezcla de linfocitos T y la superficie (por ejemplo, partículas tales como perlas), las interacciones entre las partículas y las células se minimizan. Esto selecciona las células que expresan altas cantidades de antígenos deseados para unirse a las partículas. Por ejemplo, los linfocitos T CD4+ expresan niveles más altos de CD28 y se capturan más eficazmente que los linfocitos T CD8+ en concentraciones diluidas.

Los linfocitos T para la estimulación también se pueden congelar después de la etapa de lavado, que no requiere la etapa de eliminación de monocitos. Sin pretender quedar vinculados a teoría alguna, la etapa de congelación y descongelación posterior proporciona un producto más uniforme al eliminar los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos en la población celular. Después de la etapa de lavado que elimina el plasma y las plaquetas, las células se pueden suspender en una solución de congelación. Si bien muchas soluciones y parámetros de congelación son conocidos en la técnica y serán útiles en este contexto, en un ejemplo no limitante, un método implica el uso de PBS que contiene DMSO al 20 % y albúmina de suero humano al 8 %, u otros medios de congelación celular adecuados. Luego, las células se congelan a -80 °C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se pueden utilizar otros métodos de congelación controlada, así como la congelación no controlada inmediatamente a -20 °C o en nitrógeno líquido.

#### Linfocitos Th17/Tc17

En una realización, la presente invención se dirige a linfocitos Th17 genéticamente modificados. Los linfocitos Th17 que se han modificado para expresar un CAR de la invención se redirigen hacia un antígeno específico (por ejemplo, mesotelina) y, por lo tanto, se pueden usar para tratar cánceres asociados con el antígeno específico. La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que la incorporación del dominio de señalización ICOS dentro del dominio citoplasmático del CAR aumenta la persistencia de los Th17, aumenta la producción de IL-17, aumenta la actividad antitumoral y disminuye la producción de IL-2.

Los linfocitos T colaboradores (también conocidos como linfocitos T efectoros o linfocitos Th) son un subgrupo de linfocitos (un tipo de glóbulo blanco o leucocito) que desempeña un papel importante en el establecimiento y la maximización de las capacidades del sistema inmune y, en particular, en la activación y dirigiendo otras células inmunitarias. Se han identificado diferentes tipos de linfocitos Th que se originan en el resultado de un proceso de diferenciación y están asociadas con un fenotipo específico. Tras el desarrollo de linfocitos T, los linfocitos T maduros, sin exposición previa (que significa que nunca han estado expuestos al antígeno al que pueden responder) abandonan el timo y comienzan a difundirse por todo el cuerpo. Se sabe que los linfocitos T sin exposición previa se diferencian en un fenotipo de linfocitos T colaboradores 1 (Th1), T colaboradores 2 (Th2), T colaboradores 17 (Th17) o linfocitos T reguladores (Treg).

Cada uno de estos tipos de linfocitos Th segrega citocinas, proteínas o péptidos que estimulan o interactúan con

otros leucocitos, incluidos los linfocitos Th. Sin embargo, cada tipo de célula tiene un fenotipo y actividad peculiar que interfiere y a menudo entra en conflicto con el otro.

Th1, Th2 y Th17 (T colaborador inflamatorio o Th inflamatorio), promueve respuestas inflamatorias a través de la secreción de citocinas proinflamatorias, tales como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17, IL21, IL23 y/o mediante la activación y/o inhibición de otros linfocitos T, incluidos otros linfocitos Th (por ejemplo, el linfocito Th1 suprime Th2 y Th17, Th2 suprime Th1 y Th17). Los Tregs en cambio, son un componente del sistema inmunitario que suprime las actividades biológicas de otras células asociadas a una respuesta inmunitaria. En particular, los tregs pueden secretar citocinas inmunosupresoras TGF- $\beta$  e interleucina 10, y se sabe que pueden limitar o suprimir la inflamación.

Los linfocitos Th17 o de otro modo las células que presentan el fenotipo de linfocitos Th17 pueden tener una variedad de propiedades fenotípicas específicas, dependiendo de las condiciones empleadas. Dichas propiedades fenotípicas incluyen la producción de IL-17A e IFN $\gamma$ . Además, los linfocitos Th17 expandidos continúan produciendo IL-17A e IFN $\gamma$  incluso después de su expansión primaria. En algunos casos, Los linfocitos Th17 coexpresaron tanto ROR $\gamma$ t como T-bet, factores de transcripción que regulan el desarrollo de linfocitos Th17 y Th1, respectivamente. En algunos casos, los linfocitos T expandidos coexpresaron IL-23R y CD161 en su superficie celular, marcadores fenotípicos asociados con los linfocitos Th17 del cordón umbilical. En algunos casos, los linfocitos Th17 expresaron ROR $\gamma$ t.

En una realización, la invención proporciona una población purificada de células precursoras Th17 ICOS+CD28+ de sangre de cordón umbilical que secretan niveles elevados de CCL20, IL-17F e IFN $\gamma$  tras la estimulación. Las células de la presente invención se pueden usar en aplicaciones clínicas para el diseño de inmunoterapias para pacientes con cáncer, enfermedad infecciosa y autoinmunidad.

#### 25 Activación y expansión de linfocitos Th17

Ya sea antes o después de la modificación genética de los linfocitos T para expresar un CAR deseable, los linfocitos T se pueden activar y expandir generalmente usando los métodos descritos, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041; y la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20060121005.

En general, los linfocitos T de la invención se expanden por contacto con una superficie que se une a un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de los linfocitos T. En particular, las poblaciones de linfocitos T se pueden estimular tal como se describe en el presente documento, tal como por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o por contacto con un activador de proteína quinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de los linfocitos T, se utiliza un ligando que une la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de linfocitos T se puede poner en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, bajo condiciones apropiadas para estimular la proliferación de los linfocitos T. Para estimular la proliferación de linfocitos Th17, las células se pueden poner en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-ICOS. Los linfocitos Th17 también se pueden estimular con células presentadoras de antígenos artificiales (artificial Antigen Presenting Cells, aAPC) que expresan el ligando ICOS (ICOSL). La estimulación se puede realizar en presencia de citocinas polarizadoras de Th17. Un ejemplo de citocinas polarizadoras de Th17 incluye, pero sin limitación, citocinas IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-23 y anticuerpos neutralizantes IFN $\gamma$  e IL-4.

Un linfocito T se puede estimular poniendo en contacto un agente con un resto de superficie celular en el linfocito T. En un aspecto de la presente invención, los anticuerpos contra CD3 e ICOS se cargan en una aAPC. Además, la estimulación puede incluir cualquier ligando que se une al complejo TCR/CD3 e inicie una señal de estimulación primaria. Este ligando se puede utilizar como un agente de activación primario cargado o expresado por la aAPC. Cualquier ligando que se une a ICOS e inicia la vía de transducción de señales de ICOS, provocando así la coestimulación de la célula con un ligando CD3 y potenciando la activación de una población de linfocitos T, es un ligando ICOS y, en consecuencia, es un agente coestimulador.

Los linfocitos T se pueden exponer a una perla que comprende un primer agente que se une al complejo TCR/CD3 e inicia una señal de estimulación primaria y un segundo agente que se une a ICOS e inicia la vía de transducción de señal de ICOS, provocando así la coestimulación de la célula con un ligando CD3 y potenciando la activación de una población de linfocitos T.

Las células estimuladas se activan tal como se muestra mediante la inducción de la transducción de señales, la expresión de marcadores de superficie celular y/o la proliferación. Los marcadores apropiados para los linfocitos Th17 incluyen, entre otros, su capacidad para secretar niveles elevados de IL-17A, IL-17F y CCL20. Además, las células generadas y expandidas de acuerdo con el método de coestimulación ICOS no solo presentan una producción elevada de citocinas asociadas a los Th17 sino que también presentan una secreción elevada de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-21 en comparación con las células coestimuladas con CD28.

En el contexto de generar linfocitos Th17 mediante la estimulación de ICOS en linfocitos T, se puede diseñar un aAPC para que comprenda un primer agente que se una al complejo TCR/CD3 del linfocito T y un segundo agente que se una a ICOS, el aAPC se puede diseñar para que comprenda una citocina que promueve la diferenciación de Th17. Las citocinas ejemplares de diferenciación de Th17 incluyen pero sin limitación IL-2, IL-6, IL-23 y IL-1.

Por consiguiente, la estimulación de linfocitos T puede incluir una aAPC que se ha modificado genéticamente para expresar agentes estimuladores, agentes coestimuladores y/o citocinas, así como otros polipéptidos. La aAPC se puede diseñar para que exprese y secrete cualquier citocina deseable que promueva la diferenciación de Th17 utilizando los métodos desvelados en el presente documento o los métodos conocidos en la técnica para modificar genéticamente una célula. La citocina puede ser una citocina de longitud completa, o un fragmento, homólogo, variante o mutante de la citocina. Una citocina incluye una proteína que es capaz de afectar a la función biológica de otra célula. Una función biológica afectada por una citocina puede incluir, pero sin limitación, crecimiento celular, diferenciación celular o muerte celular. Al estimular la estimulación de los linfocitos Th17, la citocina se puede unir a un receptor específico en la superficie de la célula, promoviendo así la diferenciación de Th17. Una citocina preferida incluye, entre otros, un factor de crecimiento hematopoyético, una interleucina, un interferón, una molécula de la superfamilia de inmunoglobulina, una molécula de la familia del factor de necrosis tumoral y/o una quimiocina. Una citocina incluye pero no se limita al factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), factor de necrosis tumoral beta (TNF $\beta$ ), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina-12 (IL-12), interleucina-15 (IL-15), interleucina-21 (IL-21), interleucina-23 (IL-23), interferón alfa (IFN $\alpha$ ), interferón beta (IFN $\beta$ ), interferón gamma (IFN $\gamma$ ) e IGIF, entre muchos otros. Una citocina más preferida incluye una citocina que promueve la diferenciación de Th17, que incluye pero no se limita a IL-2, IL-6, IL-1 (por ejemplo, IL-1 $\beta$ ). Un experto en la materia apreciaría, una vez provisto de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que la invención abarca cualquier citocina que promueva la diferenciación de Th17, tal como las conocidas en la técnica, así como cualquiera descubierta en el futuro.

Además de diseñar una aAPC para que comprenda una citocina que promueve la diferenciación de Th17, se puede diseñar la aAPC para que comprenda una molécula inhibitoria que puede bloquear una citocina que interfiere con el proceso de diferenciación de Th17. Por ejemplo, se puede diseñar la aAPC para que secrete un anticuerpo neutralizante que puede inhibir una citocina que interfiere con la diferenciación Th17. Una citocina que interfiere con el proceso de diferenciación de Th17 incluye, entre otros, IFN $\gamma$  e IL-4.

Cuando la aAPC se ha diseñado para que exprese una citocina deseada que promueve la diferenciación de Th17 y/o el inhibidor de una citocina que interfiere con la diferenciación de Th17, se proporciona un método para activar y/o estimular una población de linfocitos T para promover la diferenciación de Th17 en ausencia de citocinas añadidas por vía exógena. Además, tal diferenciación de Th17 puede tener lugar *in vivo*.

En determinadas realizaciones, la señal de estimulación primaria y la señal de coestimulación para los linfocitos T se pueden proporcionar por diferentes protocolos. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando se acoplan a una superficie, los agentes se pueden acoplar a la misma superficie (es decir, en formación "cis") o a superficies separadas (es decir, en formación "trans"). Como alternativa, un agente puede estar acoplado a una superficie y el otro agente en solución. En una realización, el agente que proporciona la señal coestimuladora está unido a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En determinadas realizaciones, ambos agentes pueden estar en solución. En otra realización, los agentes pueden estar en forma soluble y luego reticulados a una superficie, tal como una célula que expresa receptores Fc o un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a los agentes. En este sentido, véase, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 20040101519 y 20060034810 para células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC) que se contemplan para su uso en la activación y expansión de linfocitos T en la presente invención.

En una realización, los dos agentes están inmovilizados en perlas, ya sea en la misma perla, es decir, "cis", o en perlas separadas, es decir, "trans". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que proporciona la señal coestimuladora es un anticuerpo anti-ICOS o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y ambos agentes se co-inmovilizan en la misma perla en cantidades moleculares equivalentes. En una realización, se utiliza una proporción 1:1 de cada anticuerpo unido a las perlas para el crecimiento de Th17. En determinados aspectos de la presente invención, se usa una proporción de anticuerpos anti-CD3: anti-ICOS unidos a las perlas de manera que se observa un aumento en la expansión de linfocitos Th17 en comparación con la expansión observada usando una proporción de 1:1. En una realización, la proporción de anticuerpos CD3:ICOS unidos a las perlas varía de 100:1 a 1:100 y todos los valores enteros entre ellos. En un aspecto de la presente invención, se une más anticuerpo anti-ICOS a las partículas que el anticuerpo anti-CD3, es decir, la proporción de CD3:ICOS es menor que uno. En determinadas realizaciones de la invención, la proporción de anticuerpo anti-ICOS a anticuerpo anti-CD3 unido a las perlas es mayor que 2:1. En una realización particular, se utiliza una proporción de anticuerpos de CD3:ICOS de 1:100 unido a las perlas. En otra realización, se utiliza una proporción de anticuerpos de CD3:ICOS de 1:75 unido a las perlas. En una realización adicional, se utiliza una proporción de anticuerpos de CD3:ICOS de 1:50 unido a las perlas. En otra

realización, se utiliza una proporción de anticuerpos de CD3:ICOS de 1:30 unido a las perlas. En una realización preferida, se utiliza una proporción de anticuerpos de CD3:ICOS de 1:10 unido a las perlas. En otra realización, se utiliza una proporción de anticuerpos de CD3:ICOS de 1:3 unido a las perlas. En otra realización más, se utiliza una proporción de anticuerpos de CD3:ICOS de 3:1 unido a las perlas.

5 Las proporciones de partículas frente a células de 1:500 a 500:1 y cualquier valor entero en el medio se puede usar para estimular los linfocitos T u otras células diana. Tal como se puede apreciar fácilmente los expertos en la materia, la proporción de partículas frente a células puede depender del tamaño de partícula en relación con la célula diana. Por ejemplo, las perlas de pequeño tamaño solo podrían unirse a unas pocas células, mientras que las perlas más grandes podrían unirse a muchas. En ciertas realizaciones, la proporción de células frente a partículas varía de 1:100 a 100:1 y cualquier valor entero intermedio y en realizaciones adicionales, la proporción comprende 1:9 a 9:1 y cualquier valor entero intermedio, también se puede utilizar para estimular los linfocitos T. La proporción de partículas acopladas anti-CD3 y anti-ICOS frente a los linfocitos T que dan como resultado la estimulación de los linfocitos T puede variar tal como se indicó anteriormente, sin embargo, ciertos valores preferidos incluyen 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 y 15:1 con una proporción preferida de al menos 1:1 partículas por linfocito T. En una realización, se utiliza una proporción de partículas frente a células de 1:1 o menos. En una realización particular, una proporción preferida de partícula:célula es 1:5. En realizaciones adicionales, la proporción de partículas frente a células puede variar según el día de la estimulación. Por ejemplo, en una realización, la proporción de partículas frente a células es de 1:1 a 10:1 el primer día y se añaden partículas adicionales a las células todos los días o cada dos días a partir de entonces durante un máximo de 10 días, en proporciones finales de 1:1 a 1:10 (basado en recuentos de células en el día de la adición). En una realización particular, la proporción de partículas frente a células es de 1:1 en el primer día de estimulación y ajustada a 1:5 en el tercer y quinto día de estimulación. En otra realización, las partículas se añaden diariamente o en días alternos a una proporción final de 1:1 el primer día y 1:5 el tercer y quinto día de estimulación. En otra realización, la proporción de partículas frente a células es de 2:1 en el primer día de estimulación y ajustada a 1:10 en el tercer y quinto día de estimulación. En otra realización, las partículas se añaden diariamente o en días alternos a una proporción final de 1:1 el primer día y 1:10 el tercer y quinto día de estimulación. Un experto en la materia apreciará que una variedad de otras proporciones pueden ser adecuadas para su uso en la presente invención. En particular, las proporciones variarán dependiendo del tamaño de partícula y del tamaño y tipo de célula.

En realizaciones adicionales de la presente invención, las células, tales como los linfocitos T, se combinan con perlas recubiertas de agente, las perlas y las células se separan posteriormente, y luego las células se cultivan. En una realización alternativa, antes del cultivo, las perlas y las células recubiertas con agente no se separan sino que se cultivan juntas. En una realización adicional, las perlas y las células se concentran primero mediante la aplicación de una fuerza, tal como una fuerza magnética, que da como resultado un aumento de la ligadura de marcadores de la superficie celular, induciendo así la estimulación celular.

A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular pueden ligarse permitiendo que las perlas paramagnéticas a las que se unen los anti-CD3 y anti-ICOS entren en contacto con los linfocitos T. En una realización, las células (por ejemplo,  $10^4$  a  $10^9$  linfocitos T) y las perlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas en una proporción de 1:1) se combinan en un tampón, preferentemente PBS (sin cationes divalentes tales como calcio y magnesio). De nuevo, los expertos en la materia pueden apreciar fácilmente que se puede usar cualquier concentración celular. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy rara en la muestra y comprender solo el 0,01 % de la muestra o toda la muestra (es decir, el 100 %) puede comprender la célula diana de interés. Por consiguiente, cualquier número de células está dentro del contexto de la presente invención. En determinadas realizaciones, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las partículas y las células (es decir, aumentar la concentración de células), para garantizar el máximo contacto de células y partículas. Por ejemplo, en una realización, se utiliza una concentración de aproximadamente 2 mil millones de células/ml. En otra realización, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En una realización adicional, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En otra realización más, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En realizaciones adicionales, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml.

El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un mayor rendimiento celular, activación celular y expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficaz de las células que pueden expresar débilmente los antígenos diana de interés, tales como los linfocitos T CD28 negativos. Dichas poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas en ciertas realizaciones. Por ejemplo, el uso de alta concentración de células permite una selección más eficaz de linfocitos T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

En una realización de la presente invención, la mezcla se puede cultivar durante varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor entero por hora en el medio. En otra realización, la mezcla se puede cultivar durante 21 días. En una realización de la invención, las perlas y los linfocitos T se cultivan juntos durante aproximadamente ocho días. En otra realización, las perlas y los linfocitos T se cultivan juntos durante 2-3 días. También pueden desearse varios ciclos de estimulación de modo que el tiempo de cultivo de los linfocitos T

5 pueda ser de 60 días o más. Las condiciones apropiadas para el cultivo de linfocitos T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio mínimo esencial o medio RPMI 1640 o, X-vivo 15, (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y la viabilidad, incluyendo suero (por ejemplo, suero bovino fetal o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF $\beta$  y TNF- $\alpha$  o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el experto en la materia. Otros aditivos para el cultivo de las células incluyen, pero sin limitación, tensioactivo, plasmanato, y agentes reductores tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, ya sea libre de suero o suplementado con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y la expansión de los linfocitos T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomycin, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se infunden en un sujeto. Las células diana se mantienen en condiciones necesarias para apoyar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura adecuada (por ejemplo, 37 ° C) y atmósfera (por ejemplo, aire más CO<sub>2</sub> al 5 %).

15 Los linfocitos T que se exponen a tiempos de estimulación variados pueden presentar características diferentes. Por ejemplo, los productos típicos de células mononucleares de sangre periférica o de sangre periférica tienen una población de linfocitos T colaboradores (Th, CD4<sup>+</sup>) que es mayor que la población de linfocitos T citotóxicos o supresores (Tc, CD8<sup>+</sup>). Por consiguiente, dependiendo del propósito del tratamiento, infundir a un sujeto con una población de linfocitos T que comprende predominantemente linfocitos Th puede ser ventajoso. De manera similar, si se ha aislado un subconjunto específico de antígeno de linfocitos Tc, puede ser beneficioso expandir este subconjunto en mayor grado.

25 Además, Además de los marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero en gran parte, de manera reproducible durante el transcurso del proceso de expansión celular. Por lo tanto, dicha reproducibilidad permite la capacidad de personalizar un producto de linfocitos T activados para fines específicos.

30 Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que las metodologías de estimulación celular descritas en el presente documento se pueden llevar a cabo en una variedad de entornos (es decir, recipientes). Por ejemplo, dichos recipientes pueden ser matraces de cultivo, bolsas de cultivo, o cualquier recipiente capaz de contener células, preferentemente en un ambiente estéril. En una realización de la presente invención, un biorreactor también es útil. Por ejemplo, actualmente, varios fabricantes fabrican dispositivos que se pueden usar para hacer crecer células y se pueden usar en combinación con los métodos de la presente invención. Véase, por ejemplo, la patentes que cubren biorreactores tales como las Pat. de EE.UU. N.º 6.096.532; 5.985.653; 5.888.807; 5.190.878, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento a modo de referencia en su totalidad.

### 35 Aplicación terapéutica

40 La presente invención abarca una célula (por ejemplo, un linfocito Th17) modificada para expresar un CAR que combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con un dominio intracelular de ICOS codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6 solo o con cualquier combinación de CD3-zeta, CD28 o 4-1BB. Por lo tanto, en algunos casos, el linfocito Th17 transducido puede provocar una respuesta de linfocitos T mediada por CAR.

45 La invención proporciona el uso de un CAR para redirigir la especificidad de un linfocito T primario a un antígeno tumoral. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un linfocito T que expresa un CAR para su uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T a una población de células o tejido diana en un mamífero que comprende la etapa de administrar al mamífero el linfocito T que expresa un CAR, en donde el CAR comprende un resto de unión que interactúa específicamente con una diana predeterminada, una porción de cadena zeta que comprende, por ejemplo, el dominio intracelular de CD3-zeta humano, y una región de señalización coestimuladora tal como se especifica en el presente documento.

50 En una realización, la presente invención incluye linfocitos T genéticamente modificados para expresar un CAR tal como se especifica en el presente documento, para su uso en un tipo de terapia celular tal como se especifica en las reivindicaciones, en donde los linfocitos T se modifican genéticamente para expresar un CAR y el linfocito T con CAR se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida puede eliminar células tumorales en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, los linfocitos T con CAR capaces de replicarse *in vivo* dando como resultado una persistencia a largo plazo que puede llevar a un control tumoral sostenido.

60 En una realización, los linfocitos T con CAR de la invención pueden experimentar una expansión consistente de linfocitos T *in vivo* y puede persistir durante un período prolongado de tiempo. En otra realización, los linfocitos T con CAR de la invención evolucionan a linfocitos T de memoria específica que se pueden reactivar para inhibir cualquier formación o crecimiento tumoral adicional. Por ejemplo, fue inesperado que la inclusión del dominio de señalización ICOS dentro de los CAR expresados por los linfocitos Th17 genéticamente modificados dio como resultado una mayor persistencia de Th17 y una mayor actividad antitumoral. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los linfocitos T con CAR se pueden diferenciar *in vivo* en un estado de tipo memoria central tras el encuentro y la posterior eliminación de las células diana que expresan el antígeno sustituto.

Sin desear quedar ligados a teoría alguna, la respuesta de inmunidad antitumoral provocada por los linfocitos T modificados con CAR puede ser una respuesta inmunitaria activa o pasiva. Además, la respuesta inmunitaria mediada por CAR puede ser parte de una estrategia de inmunoterapia adoptiva en la que los linfocitos T modificados con CAR inducen una respuesta inmunitaria específica al dominio de unión al antígeno en el CAR. Por ejemplo, los linfocitos Th17 genéticamente modificados que expresan un CAR anti-mesotelina provocan una respuesta inmunitaria específica contra las células que expresan mesotelina.

Si bien los datos desvelados en el presente documento desvelan de manera específica el vector lentivírico que comprende scFv SS1, bisagra de CD8 $\alpha$  humano, dominio transmembrana ICOS y dominios de señalización ICOS y CD3zeta, la invención se debe interpretar para incluir cualquier número de variaciones para cada uno de los componentes de la construcción tal como se describe en otra parte del presente documento, dentro de los límites de la materia objeto reivindicada. Es decir, la invención incluye el uso de cualquier dominio de unión a antígeno en el CAR para generar una respuesta de linfocitos T mediada por CAR específica para el dominio de unión a antígeno. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno en el CAR de la invención puede dirigirse a un antígeno tumoral con el propósito de tratar el cáncer.

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

Los cánceres hematológicos son cánceres de la sangre o la médula ósea. Los ejemplos de cánceres hematológicos (o hematógenos) incluyen leucemias, incluyendo leucemias agudas (como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tales como leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin (formas indolentes y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de cadena pesada, síndrome mielodisplásico, tricoleucemia y mielodisplasia.

Los tumores sólidos son masas anómalas de tejido que generalmente no contienen quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. Los diferentes tipos de tumores sólidos se nombran por el tipo de células que los forman (tales como los sarcomas, carcinomas y linfomas). Ejemplos de tumores sólidos, como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, carcinoma de colon, neoplasia linfóide, cáncer pancreático, cáncer de mama, cánceres de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitomas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello de útero, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga, melanoma y tumores del SNC (tales como un glioma (como el glioma del tronco encefálico y los gliomas mixtos), astrocitoma de glioblastoma (también conocido como glioblastoma multiforme), linfoma del SNC, germinoma, meduloblastoma, schwannoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma y metástasis cerebral).

En una realización, la porción del resto de unión a antígeno del CAR de la invención está diseñada para tratar un cáncer particular. Por ejemplo, el CAR diseñado para dirigirse a CD19 se puede usar para tratar cánceres y trastornos que incluyen, entre otros, pre-B ALL (indicación pediátrica), ALL adulto, linfoma de células del manto, linfoma difuso de linfocitos B grandes, último recurso tras trasplante alogénico de médula ósea y similares.

En otra realización, el CAR puede diseñarse para que se dirija a CD22 para tratar el linfoma difuso de células B grandes.

En una realización, los cánceres y trastornos incluyen, pero no se limitan a, LLA pre-B (indicación pediátrica), ALL adulto, linfoma de células del manto, linfoma difuso de linfocitos B grandes, último recurso tras el trasplante alogénico de médula ósea y similares se pueden tratar usando una combinación de CAR que se dirigen a CD19, CD20, CD22 y ROR1.

En una realización, el CAR se puede diseñar para que se dirija a la mesotelina para tratar el mesotelioma, cáncer pancreático, cáncer de ovario y similares. En otra realización, el CAR se puede diseñar para que se dirija a CD33/IL3Ra para tratar la leucemia mielógena aguda y similares. En una realización adicional, el CAR se puede diseñar para que se dirija a c-Met para tratar el cáncer de mama triple negativo, cáncer de pulmón no microcítico y

similares.

En una realización, el CAR se puede diseñar para que se dirija a PSMA para tratar el cáncer de próstata y similares. En otra realización, el CAR se puede diseñar para que se dirija al Glucolípidio F77 para tratar el cáncer de próstata y similares. En una realización adicional, el CAR se puede diseñar para que se dirija a EGFRvIII para tratar el glioblastoma y similares.

En una realización, el CAR se puede diseñar para que se dirija a GD-2 para tratar el neuroblastoma, melanoma y similares. En otra realización, el CAR se puede diseñar para que se dirija al TCR NY-ESO-1 para tratar el mieloma, sarcoma, melanoma y similares. En una realización adicional, el CAR se puede diseñar para que se dirija al TCR MAGE A3 para tratar el mieloma, sarcoma, melanoma y similares.

Sin embargo, la invención no debe interpretarse como limitada únicamente a las dianas de antígeno y enfermedades desveladas en el presente documento. En cambio, la invención debe interpretarse como que incluye cualquier diana antigénica que esté asociada con una enfermedad en la que se pueda usar un CAR para tratar la enfermedad.

Los linfocitos T modificados con CAR de la invención también pueden servir como un tipo de vacuna para inmunización *ex vivo* y/o terapia *in vivo* en un mamífero. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

Con respecto a la inmunización *ex vivo*, se produce *in vivo* al menos uno de los siguientes antes de administrar la célula a un mamífero: i) expansión de las células, ii) introducción de un ácido nucleico que codifica un CAR a las células, y/o iii) crioconservación de las células.

Los procedimientos *ex vivo* son bien conocidos en la técnica y se analizan más detalladamente a continuación. En resumen, las células se aíslan de un mamífero (preferentemente un ser humano) y se modifican genéticamente (es decir, se transducen o transfectan *in vitro*) con un vector que expresa un CAR desvelado en el presente documento. La célula modificada con CAR se puede administrar a un receptor mamífero para proporcionar un beneficio terapéutico. El receptor mamífero puede ser humano y la célula modificada con CAR puede ser autóloga con respecto al receptor. Como alternativa, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor.

El procedimiento para la expansión *ex vivo* de las células madre y progenitoras hematopoyéticas se describe en la Pat. de EE.UU. N.º 5.199.942, se puede aplicar a las células de la presente invención. Otros métodos adecuados son conocidos en la técnica, por lo tanto, la presente invención no se limita a ningún método particular de expansión *ex vivo* de las células. En resumen, el cultivo y la expansión *ex vivo* de los linfocitos T comprende: (1) recolectar células madre hematopoyéticas CD34+ y células progenitoras de un mamífero de extracción de sangre periférica o explantes de médula ósea; y (2) expandir tales células *ex vivo*. Además de los factores de crecimiento celular descritos en la Pat. de EE.UU. N.º 5.199.942, otros factores tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit, se pueden utilizar para el cultivo y la expansión de las células.

Además de usar una vacuna basada en células en términos inmunización *ex vivo*, la presente invención también proporciona composiciones y su uso en métodos de inmunización *in vivo* para provocar una respuesta inmunitaria dirigida contra un antígeno en un paciente.

En general, las células activadas y expandidas como se describe en el presente documento se pueden utilizar en el tratamiento y prevención de enfermedades que surgen en individuos que están inmunocomprometidos. En particular, los linfocitos T modificados con CAR de la invención se usan en el tratamiento del cáncer. En determinadas realizaciones, las células de la invención se usan en el tratamiento de pacientes con riesgo de desarrollar cáncer. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para el tratamiento o prevención del cáncer que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de los linfocitos T modificados con CAR de la invención.

Los linfocitos T modificados con CAR de la presente invención se pueden administrar solos o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares. En resumen, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una población de células diana tal como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención se formulan preferentemente para administración intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de una manera apropiada para la enfermedad que se va a tratar (o prevenir). La cantidad y la frecuencia de la administración estarán determinadas por factores tales como la condición del paciente y el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, aunque las

dosis apropiadas se pueden determinar mediante ensayos clínicos.

5 Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente eficaz", "una cantidad antitumoral eficaz", "una cantidad  
inhibidora de tumores eficaz" o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente  
invencción que se va a administrar se puede determinar por un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales  
de la edad, el peso, el tamaño del tumor, el grado de infección o metástasis, y la condición del paciente (sujeto). En  
general, se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende los linfocitos T descritos en el presente  
documento se puede administrar a una dosis de  $10^4$  a  $10^9$  células/kg de peso corporal, preferentemente de  $10^5$  a  $10^6$   
10 células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de  
linfocitos T también se pueden administrar múltiples veces a estas dosis. Las células se pueden administrar  
mediante el uso de técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, por ejemplo,  
Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988). La dosis óptima y el régimen de tratamiento para un  
paciente en particular se pueden determinar fácilmente por un experto en la técnica de la medicina haciendo un  
seguimiento del paciente en busca de signos de enfermedad y ajustando el tratamiento en consecuencia.

15 En determinadas realizaciones, se puede desear administrar linfocitos T activados a un sujeto y luego volver a  
extraer sangre (o realizar una aféresis), activar los linfocitos T de la misma según la presente invención, y reinfundir  
al paciente con estos linfocitos T activados y expandidos. Este proceso se puede llevar a cabo varias veces cada  
pocas semanas. En determinadas realizaciones, Los linfocitos T se pueden activar a partir de extracciones de  
20 sangre de 10cc a 400cc. En determinadas realizaciones, Los linfocitos T se activan a partir de extracciones de  
sangre de 20 cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc o 100cc. Sin desear quedar ligado a la teoría, el uso de  
este protocolo de extracción múltiple/reinfusión múltiple de sangre puede servir para seleccionar ciertas poblaciones  
de linfocitos T.

25 La administración de las composiciones objeto se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente, incluso por  
inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en el  
presente documento se pueden administrar a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral,  
intranodular, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa (i.v.), o por vía intraperitoneal. En una  
realización, las composiciones de linfocitos T de la presente invención se administran a un paciente mediante  
30 inyección intradérmica o subcutánea. En otra realización, las composiciones de linfocitos T de la presente invención  
se administran preferentemente por inyección i.v. Las composiciones de linfocitos T se pueden inyectar directamente  
en un tumor, nódulo linfático o sitio de infección.

35 En determinadas realizaciones de la presente invención, células activadas y expandidas usando los métodos  
descritos en el presente documento, u otros métodos conocidos en la técnica donde los linfocitos T se expanden a  
niveles terapéuticos, se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después)  
cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, incluidos, pero sin limitación, el tratamiento con agentes  
tales como la terapia antivírica, cidofovir e interleucina-2, El tratamiento con citarabina (también conocido como ARA-  
C) o natalizumab para pacientes con EM o el tratamiento con efalizumab para pacientes con psoriasis u otros  
40 tratamientos para pacientes con LMP. En realizaciones adicionales, los linfocitos T de la invención se pueden usar  
en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina,  
metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos tales como CAM PATH,  
anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludaribina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido  
micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación. Estos fármacos inhiben la calcineurina fosfatasa  
45 dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la p70S6 cinasa que es importante para la señalización  
inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu et al., *Cell* 66:807-815, 1991; Henderson et al., *Immun.*  
73:316-321, 1991; Bierer et al., *Curr. Opin. Immun.* 5:763-773, 1993). En una realización adicional, las  
composiciones celulares de la presente invención se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, de  
manera simultánea o después) trasplante de médula ósea, terapia ablativa de linfocitos T utilizando agentes de  
50 quimioterapia tales como fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos tales como  
OKT3 o CAMPATH. En otra realización, las composiciones celulares de la presente invención se administran  
después de una terapia ablativa de células B, tal como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por  
ejemplo, en una realización, los sujetos se pueden someter a un tratamiento convencional con altas dosis de  
quimioterapia seguida de trasplante de células madre de sangre periférica. En determinadas realizaciones, después  
55 del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente invención. En  
una realización adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

60 La dosificación de los tratamientos anteriores que se administrarán a un paciente variará con la naturaleza precisa  
de la afección que se está tratando y el receptor del tratamiento. La escala de las dosis para la administración en  
seres humanos se puede realizar de acuerdo con las prácticas aceptadas en la técnica. La dosis para CAMPATH,  
por ejemplo, generalmente estará en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto,  
normalmente administrado diariamente durante un período entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es de 1 a 10  
mg por día, aunque en algunos casos se pueden usar dosis mayores de hasta 40 mg por día (descrita en la Pat. de  
EE.UU. N.º 6.120.766).

65 EJEMPLOS EXPERIMENTALES

La invención se describe adicionalmente en detalle por referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos, y no están destinados a ser limitantes a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, la invención no debe interpretarse de ninguna manera como limitada a los siguientes ejemplos, pero sin embargo, debe interpretarse como que abarca todas y cada una de las variaciones que se hacen evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en el presente documento.

Sin más descripciones, se cree que un experto en la materia puede, utilizando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, fabricar y utilizar los compuestos de la presente invención y poner en práctica los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo, por lo tanto, señalan específicamente las realizaciones preferidas de la presente invención, y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera el resto de la divulgación.

**Ejemplo 1: La redirección de linfocitos Th17 con un CAR que contiene el dominio coestimulador ICOS mejora la función, la actividad antitumoral y la persistencia de los linfocitos Th17.**

La transferencia adoptiva de grandes cantidades de linfocitos Th17 polarizados y expandidos *in vitro* es una terapia atractiva para el tratamiento del cáncer. Se ha demostrado que CD278, el coestimulador inducible (ICOS) es crítico para la expansión sostenida de los linfocitos Th17 humanos después de su activación primaria. Se analizó si la incorporación del dominio intracelular ICOS en un receptor de antígeno quimérico puede promover el fenotipo Th17 después de la estimulación previa con el antígeno y mejorar la actividad antitumoral de las terapias de linfocitos T modificados.

Los materiales y métodos empleados en estos experimentos se describen a continuación.

Aislamiento, polarización, transducción y expansión de linfocitos Th17 y Tc17

Se obtuvieron muestras de sangre del Human Immunology Core de la Universidad de Pensilvania. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se aislaron negativamente usando los kits RosetteSep (Stem cell Technologies). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con FCS al 10 %, 100-U/ml de penicilina, 100 µg/ml de sulfato de estreptomycin, Hepes 10 mM en una incubadora a 37 °C y CO2 al 5 %. Para la estimulación, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se cultivaron con perlas activadoras recubiertas con anticuerpos contra CD3 e ICOS a una proporción de 1:3 de célula frente a perla. Para la polarización de Th17 y Tc17, IL-1b (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), IL-23 (20 ng/ml) y anticuerpos neutralizantes (10 mg/ml) contra IL-4 e IFN-γ (eBioscience) se añadieron el día 0 y se mantuvieron durante todo el experimento. Todos los experimentos se realizaron con suero de ternera fetal que contiene fuentes endógenas de TGF-b. Se añadió IL-2 humana (Chiron) 3 días después de la activación a una concentración final de 50 UI/ml. Aproximadamente 24 h después de la activación, los linfocitos T se transdujeron con vectores lentivíricos a una MDI de 5. Las células se contaron y se les suministró alimento cada 2 días y una vez que los linfocitos T parecían estar en reposo, según lo determinado por la reducción en la cinética de crecimiento y el tamaño celular, se usaron para ensayos funcionales o se criopreservaron.

Ensayo de proliferación de linfocitos T

Los linfocitos T criopreservados transducidos con proteínas de fusión SS1 se descongelaron, se lavaron y se colocaron en cultivo durante 12 h. Los linfocitos T (4 x 10<sup>5</sup>) se cocultivaron con 2 x 10<sup>5</sup> K562.meso. En los puntos de tiempo indicados, las células viables se contaron por exclusión con azul de tripano. Las células se alimentaron cada 2 días con medio fresco sin citocinas exógenas.

Producción de citocinas y tinción intracelular de linfocitos T reestimulados

Los linfocitos T criopreservados transducidos con proteínas de fusión SS1 se descongelaron, se lavaron y se colocaron en cultivo durante 16 h. Entonces, se examinó la expresión de las proteínas de fusión scFv SS1 en linfocitos T y se normalizó al 60 % de expresión del receptor quimérico para todos los receptores. Los linfocitos T (4 x 10<sup>5</sup>) se cocultivaron con 2 x 10<sup>5</sup> K562, K562.meso, o células tumorales y los sobrenadantes se recolectaron 24 h más tarde. Las concentraciones de IL-17A, IL17-F, IL-2, IFN-γ, TNF-α y CCL20 se determinaron utilizando los sistemas de desarrollo DuoSet® ELISA. Las concentraciones de IL-21 se determinaron usando el set Human IL-21 ELISA Ready-SET-Go!.

Anticuerpos

Los siguientes anticuerpos conjugados se adquirieron de BD Biosciences: anti-CD8 (FICT), anti-CD4 (PerCp-Cy5.5), anti-CCR7 (PE). El anti-CD45RO (Alexa Fluor 647) se adquirió de Biolegend. El anti-CD27 (V450) y el anti-CD4 (APC-H7) se compraron de BD Bioscience. El anti-CD161 PE se adquirió de R&D. El fragmento F(ab')<sub>2</sub> biotilado de sueros de anti-IgG de ratón en cabra (específico para scFv de origen murino) se adquirió de Jackson ImmunoResearch. La estreptavidina (eFluor 710) se adquirió de eBioscience, y la estreptavidina (V450) se adquirió de BD Biosciences.

Ensayo basado en citometría de flujo para cuantificar la citólisis mediada por células

Las células diana (L55) se tiñeron con CFSE y se sembraron a 50.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Los linfocitos Th17 y Tc17 criopreservados transducidos con proteínas de fusión SS1 se descongelaron, se lavaron y se colocaron en cultivo durante 16 h. Entonces, los efectores y las células diana marcadas con CFSE se cocultivaron en un intervalo de E:D por duplicado. Los cultivos se incubaron durante 4 h a 37 °C bajo CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células totales se recogieron por tripsinización y se lavaron. Los linfocitos T se tiñeron luego con un anticuerpo anti-CD45 durante 30 minutos. Tras el lavado, se añadió el colorante de ADN intercalante 7AAD a las muestras para distinguir los eventos de células muertas de las vivas. Por último, las células se lavaron y se resuspendieron en 0,4 ml de HuSA PBS al 1% y perlas de conteo. Después de la tinción, las muestras se colocaron en hielo y los datos se recogieron inmediatamente en un citómetro de flujo LSRII. Se recogieron cuatro mil perlas para cada muestra.

Análisis de citometría de flujo

Para la evaluación de la expresión superficial, las células se tiñeron en los puntos de tiempo indicados. La expresión de las diversas proteínas de fusión scFv SS1 en los linfocitos T se detectó usando anti-IgG de ratón biotinilado en cabra seguido de tinción con estreptavidina (V450) o estreptavidina (eFluor 710). Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo LSRII utilizando el programa informático DiVa (BD Biosciences), y los resultados se evaluaron utilizando el programa informático FlowJo (TreeStar).

Ratones

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Pensilvania aprobó todos los experimentos con animales. Los ratones NSG se compraron en The Jackson Laboratory y se criaron en el vivero de la Universidad de Pensilvania. Los ratones se alojaron bajo condiciones específicas libres de patógenos en jaulas de microisoladores y se les dio acceso ad libitum a alimentos en autoclave y agua acidificada.

Evaluación *in vivo* de los linfocitos T con CAR de anti-mesotelina

Los xenoinjertos de tumores se establecieron mediante inyección subcutánea de 5x10<sup>6</sup> células M108 en presencia de una solución de Matrigel al 50 % (BD Biosciences) en PBS. Se permitió que los tumores M108 crecieran en ratones NSG durante 8 semanas.

Para evaluar la eficacia intratumoral de los Th17-Tc17 redirigidos, se trató a los ratones con 2 inyecciones intratumorales de 10x10<sup>6</sup> linfocitos T (Th17:Tc17 en proporción de 1:1) o PBS en los días 61 y 67.

Las dimensiones del tumor se midieron con calibres y los volúmenes tumorales se calcularon usando la fórmula  $V = 1/2 \times L \times A \times A$ , en donde L es la longitud (dimensión más larga) y A es la anchura (dimensión más corta). Se obtuvo sangre periférica los días 21 y 51 después del tratamiento por sangrado retroorbitario o punción intracardiaca, respectivamente, y se tiñó para detectar la presencia de linfocitos T CD45, CD4 y CD8 humanos. Después de la activación de la población de CD45<sup>+</sup> humana, los subconjuntos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se cuantificaron utilizando tubos TruCount (BD Biosciences).

Colección de muestras

Los linfocitos Th17 de tres donantes normales diferentes y redirigidos con SS1-28z, SS1-BBz y SS1-ICOSz se descongelaron y se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con FCS al 10 % durante la noche. Después, los linfocitos Th17 redirigidos se estimularon con mesotelina recombinante que proviene de levadura inmovilizada. Los sedimentos celulares se recolectaron y se congelaron el día 0 antes de la estimulación, y 4 h, 8 h, 24 horas y 4 días después del reconocimiento de antígeno.

Preparación de diana de micromatriz e hibridación

Los servicios de micromatrices fueron proporcionados por la UPenn Microarray Facility, incluyendo las pruebas de control de calidad de las muestras de ARN total por Agilent Bioanalyzer y espectrofotometría Nanodrop. Todos los protocolos se llevaron a cabo como se describe en el Manual Técnico de Análisis de Expresión GeneChip de Affymetrix. En resumen, se convirtieron 100 ng de ARN total en ADNc de primera cadena usando transcriptasa inversa cebada por poli(T) y oligómeros aleatorizados que incorporaron la secuencia promotora T7. La síntesis de ADNc de segunda cadena fue seguida por transcripción *in vitro* con ARN polimerasa T7 para la amplificación lineal de cada transcripción, y el ARNc resultante se convirtió en ADNc, se fragmentó, se evaluó por Bioanalyzer, y se biotiniló por marcaje de extremo terminal con transferasa. Los rendimientos de ARNc oscilaron entre 36 y 89 g, y se añadió ADNc a las mezclas de hibridación Affymetrix, se calentó a 99 °C durante 5 minutos y se hibridó durante 16 h a 45 °C con Human Gene 1.0ST GeneChips (Affymetrix Inc., Santa Clara CA). Las micromatrices se lavaron luego a rigurosidad baja (SSPE a 6X) y alta (MES 100 mM, NaCl 0,1 M) y se tiñeron con estreptavidina-ficoeritrina. La fluorescencia se amplificó mediante la adición de anti-estreptavidina biotinilada y una alícuota adicional de la tinción con estreptavidina y ficoeritrina. Se usó un escáner confocal para recoger la señal de

fluorescencia después de la excitación a 570 nm.

Análisis de datos

- 5 Se utilizaron Affymetrix Command Console y Expression Console para cuantificar los niveles de expresión de genes específicos; los valores predeterminados proporcionados por Affymetrix se aplicaron a todos los parámetros de análisis. Se eliminaron los píxeles del borde y se calculó la intensidad promedio de los píxeles dentro del percentil 75 para cada sonda. El promedio del 2 % más bajo de intensidades de sonda que se produce en cada uno de los 16 sectores de micromatrices se estableció como fondo y se resta de todas las características en ese sector. Los conjuntos de sondas para controles positivos y negativos se examinaron en la Expression Console, y se confirmó que los parámetros de control de calidad de la instalación estaban dentro de los intervalos normales. Se promediaron las sondas para cada gen diana y se realizó la normalización entre matrices utilizando el algoritmo RMA.
- 10
- 15 Los resultados de los experimentos se describen a continuación.

Resultados

- 20 Los linfocitos Th17 polarizados se diseñaron para que expresasen un fragmento variable de cadena sencilla que se une a la mesotelina (SS1) fusionado con el dominio de transducción de señal del receptor de linfocitos T-zeta en tándem con los dominios intracelulares CD28, CD137 (41BB) o CD278 (ICOS). La secuencia de ADNc que contiene el SS1-ICOS-z CAR se clonó en un vector lentivírico de tercera generación y se expresó bajo el control del promotor EF-1. El SS1-TCOS-z contiene la secuencia líder CD8, el fragmento de cadena simple SS1 que reconoció la mesotelina humana, la región de bisagra de la cadena CD8 $\alpha$ , los dominios transmembrana e intracelular ICOS, y el dominio de transducción de señales TCR-z. (Figura 1).
- 25

Identificadores de secuencia

SEQ ID NO: N.º	IDENTIDAD
SEQ ID NO: 1	Promotor EF-1 (secuencia de ácido nucleico)
SEQ ID NO: 2	CD8a líder (secuencia de ácido nucleico)
SEQ ID NO: 3	SS1 (secuencia de ácido nucleico)
SEQ ID NO: 4	Bisagra de CD8a (secuencia de ácido nucleico)
SEQ ID NO: 5	Dominio transmembrana de ICOS (secuencia de ácido nucleico)
SEQ ID NO: 6	Dominio intracelular de ICOS (secuencia de ácido nucleico)
SEQ ID NO: 7	CD3z (secuencia de ácido nucleico)
SEQ ID NO: 8	SS1-ICOS-z CAR (secuencia de ácido nucleico)
SEQ ID NO: 9	CD8a líder (secuencia de aminoácidos)
SEQ ID NO: 10	SS1 (secuencia de aminoácidos)
SEQ ID NO: 11	Bisagra de CD8a (secuencia de aminoácidos)
SEQ ID NO: 12	Dominio transmembrana de ICOS (secuencia de aminoácidos)
SEQ ID NO: 13	Dominio intracelular de ICOS (secuencia de aminoácidos)
SEQ ID NO: 14	CD3z (secuencia de aminoácidos)
SEQ ID NO: 15	SS1-ICOS-z CAR (secuencia de aminoácidos)
SEQ ID NO: 16	Promotor de EF1 $\alpha$ que dirige SS1-ICOSCD3z

- 30 Los linfocitos Th17 se transdujeron con receptores quiméricos que contienen el fragmento de cadena única SS1, pero difieren en sus dominios intracelulares. El panel de receptores quiméricos utilizados en los experimentos incluye SS1-CD3z, SS1-28z, SS1-BBz, y la nueva construcción SS1-ICOSz. (Figura 2). La expresión del receptor quimérico en células no transducidas y transducidas se evaluó mediante citometría de flujo (Figura 2B).

- 35 Los linfocitos Th17 transducidos con CAR se cultivaron conjuntamente con células K562-meso en medios sin las citocinas polarizadoras de Th17 o IL-2. La producción de citocinas se analizó mediante ELISA 24 horas después del cocultivo. Los linfocitos Th17 transducidos con el CAR que contiene ICOS liberaron mayores cantidades de IL-17A, IL-17F y CCL20 en comparación con los CAR que no contienen el dominio ICOS. Además, los linfocitos Th17 transducidos con el CAR que contiene ICOS liberaron niveles muy bajos de IL-2 (Figura 3). Por el contrario, los linfocitos Th17 redirigidas con el SS1-28-z, secretaron mayores cantidades de IL-2 e IFN- $\gamma$  pero niveles teóricos de IL-17A e IL-17F. Además, cuando los linfocitos Th17 de cinco donantes humanos diferentes se transdujeron con los diversos CAR, las células transducidas con SS1-ICOSz mostraron un aumento significativo de la producción de IL-17 24 horas después del cocultivo con células K562-meso (Figura 4).
- 40

- 45 Los linfocitos Th17 transducidos con los diversos CAR se cultivaron conjuntamente con K562, K562-meso, o con cinco líneas celulares tumorales diferentes (M108, L55, ASPC1, BxPC3 y Ov79) en medios de cultivo sin citocinas polarizadoras de Th17 o IL-2. Después de 24 horas de cocultivo, Los linfocitos Th17 transducidos con CAR de SS1-

ICOSz liberaron mayores cantidades de IL-17A y menores cantidades de IL-2 en comparación con las células transducidas con SS1-28z (Figura 5).

5 Los linfocitos Th17 transducidos con CAR también se evaluaron para determinar su expresión de CD161. CD161 es un marcador que es indicativo del fenotipo Th17. La citometría de flujo muestra que los linfocitos Th17 transducidos con el CAR que contiene ICOS presentaron un mayor número de células CD161+ en comparación con las construcciones SS1-28z y SS1-BBz (Figura 8). Por el contrario, los linfocitos Th17 transducidos con SS1-28-z tenían una expresión baja de CD161.

10 Para medir la actividad citolítica de los linfocitos Th17/Tc17 redirigidos con receptores quiméricos, los linfocitos Tc17 y Th17 (en una proporción de 4:1) se cultivaron conjuntamente con células diana L55 durante 4 horas. La citólisis específica se determinó usando un ensayo basado en citometría de flujo, que demostró que los linfocitos Th17/Tc17 redirigidos con el CAR de SS1-ICOSz eliminaron de forma eficaz las células tumorales en un amplio intervalo de proporciones de células efectoras frente a células diana (Figura 6A). La DE50 para cada grupo se determinó utilizando un modelo de regresión logística, que mostró que la DE50 del grupo SS1-ICOSz era 6,857 (Figura 6B).

15 Para evaluar más a fondo la actividad antitumoral de los linfocitos Th17/Tc17 redirigidos, los ratones con tumores M108 preestablecidos se trataron con inyecciones intratumorales de linfocitos Th17/Tc17 o PBS. El volumen tumoral se redujo en ratones tratados con linfocitos Th17/Tc17 genéticamente redirigidos, incluidos los transducidos con CAR de SS1-ICOSz (Figura 7A). Cuando se transfirió a ratones NSG con tumores preestablecidos vascularizados grandes, los linfocitos Th17/Tc17 redirigidos con respuestas antitumorales mejoradas mediadas por SS1-ICOS-z, con el 70 % de los ratones que muestran remisión completa. La presencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ humanos en la sangre periférica de los ratones que portaban M108 se cuantificó por FACS. El análisis de FACS mostró que los recuentos de CD4+ humanos fueron significativamente mayores en ratones tratados con linfocitos Th17/Tc17 transducidos con SS1-ICOSz (Figura 7B). De manera importante, la incorporación del dominio intracelular ICOS en el CAR aumentó significativamente la persistencia de los linfocitos Th17 después de la infusión en comparación con la incorporación de dominios intracelulares CD28 o 41BBz, aunque la persistencia de linfocitos Tc17 fue similar en todos los grupos.

20 También se evaluaron los CAR basados en ICOS que incluían una combinación de ICOS y otros dominios coestimuladores. Se diseñó y construyó una construcción para que contenga el dominio de transducción de señal CD3 zeta junto con los dominios coestimuladores ICOS y CD137 (4-1BB) (Figura 9A). Los linfocitos Th17 se transdujeron para que expresasen un CAR que contenía el dominio coestimulador ICOS, con o sin la inclusión del dominio coestimulador CD137 (4-1BB). Los linfocitos Th17 transducidos ( $4 \times 10^5$ , 60% de receptor quimérico positivo) se cultivaron conjuntamente con  $2 \times 10^5$  de K562, K562meso o las células tumorales indicadas en ausencia de citocinas exógenas. Los sobrenadantes se obtuvieron 24 h después del cocultivo y la IL-17A, IL-2 e IFN $\gamma$  se analizaron por ELISA. Se observó que la incorporación del dominio de señalización CD137 en combinación con ICOS no alteró el perfil de citocinas de los linfocitos Th17 redirigidos con un CAR que contenía solo el dominio coestimulador ICOS (Figura 9B).

30 Los CAR que incluyen los dominios ICOS y CD137 se evaluaron adicionalmente para determinar su capacidad para dirigir la expansión de los linfocitos T. Los linfocitos Th17 redirigidos se cultivaron conjuntamente con APC irradiada que expresaba mesotelina en una proporción de 1:1 en ausencia de citocinas exógenas. La expansión de los linfocitos Th17 redirigidos se midió en respuesta a la estimulación específica de mesotelina. Las células viables se contaron por exclusión de azul de tripano en diversos puntos de tiempo. Se observó que la incorporación del dominio de señalización CD137 en CAR basado en ICOS mejora la expansión de linfocitos T (Figura 10A). Se comparó el fenotipo de las células que expresan CAR basadas en ICOS que contienen o no el dominio de señalización de CD137. El porcentaje de células CAR<sup>4</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> que expresan CCR7 y CD27 se analizó con citometría de flujo el día 0 (antes del reconocimiento de Ag) u 11 días después de la estimulación. Se observó que la incorporación del dominio de señalización CD137 en CAR basado en ICOS dirige las células hacia un fenotipo de memoria.

35 También se observó que diferentes genes se expresaban de manera diferencial en el grupo ICOSz en comparación con los grupos 28z y BBz en los diferentes puntos de tiempo. Un resumen de estos genes se enumera en las Tablas 1-8.

55 *Tabla 1. Genes regulados positivamente de manera diferencial en linfocitos Th17 redirigidos con SS1-ICOSz en comparación con SS1-BBz a las 4 horas tras el reconocimiento de antígeno.* El perfil de expresión génica se realizó en linfocitos T antes de la activación (día 0) y 4 h tras el reconocimiento de antígeno. Solo se muestran los genes que se regulan positivamente de manera diferencial en las células ICOSz en comparación con las células BBz mediante un cambio > 2 veces que tenía una tasa de falso descubrimiento (TFD) < 0,05. Los genes que mostraron un cambio > 2 veces a las 4 h en comparación con 0 h en el grupo SS 1-ICOSz están marcados en negrita.

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a BB)	Múltiplo de variación (4h frente a 0h)
IL17A	interleucina 17A	NM_002190	2,4E-08	10,2	15,9
CCL20	quimiocina (motivo C-C) ligando 20	NM_004591	2,0E-07	8,3	12,0
IL31	interleucina 31	NM_001014336	6,0E-04	5,8	10,1
IL22	interleucina 22	NM_020525	1,0E-03	5,7	29,6
CD160	Molécula CD160	NM_007053	8,8E-08	5,1	5,4
IL10	interleucina 10	NM_000572	1,8E-06	4,7	6,8
CRTAM	molécula de linfocito T citotóxico y regulador	NM_019604	2,4E-04	4,5	11,0
XCL2	quimiocina (motivo C) ligando 2	NM_003175	1,4E-06	4,5	10,2
SIPA1L2	asociada a la proliferación inducida por señal 1 como 2	NM_020808	8,9E-09	3,9	8,8
TGFBR3	factor de crecimiento transformador, receptor beta III	NM_003243	1,4E-05	3,9	1,5
B3GNT5	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa	NM_032047	1,1E-03	3,6	13,5
THBS1	trombospondina 1	NM_003246	7,1E-05	3,4	3,2
IL17F	interleucina 17F	NM_052872	1,1E-04	3,3	2,7
MFSD2A	dominio de superfamilia facilitador principal que contiene 2A	NM_001136493	1,0E-06	3,3	5,0
NR4A2	subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2	NM_006186	4,7E-04	2,9	26,1
KLRB1	subfamilia B del receptor tipo lectina de células citolíticas, miembro 1	NM_002258	3,2E-02	2,9	-1,7
TAGAP	Proteína activadora de RhoGTPasa de activación de linfocitos T	NM_054114	9,1E-11	2,9	2,8
IL1R1	receptor de interleucina 1, tipo I	NM_000877	5,2E-06	2,8	2,9
ADAM12	ADAM metalopeptidasa dominio 12	NM_003474	3,8E-02	2,8	1,1
SNORD20	ARN nucleolar pequeño	NR_002908	3,7E-04	2,7	2,7
SLC16A14	familia de vehículo de solutos 16, miembro 14 (transportador de ácido monocarboxílico 14)	NM_152527	6,5E-05	2,7	2,4
FASLG	Ligando Fas (superfamilia TNF, miembro 6)	NM_000639	1,2E-07	2,7	10,2
CDC42EP3	Proteína efectora CDC42 (unión a Rho GTPasa) 3	NM_006449	2,3E-05	2,7	1,8
GLDC	glicina deshidrogenasa (dcarboxilante)	NM_000170	7,5E-03	2,6	3,1
PHEX	homólogo de endopeptidasa reguladora de fosfato, ligado a X	NM_000444	4,7E-04	2,6	3,8
PTGIS	prostaglandina 12 (prostaciclina) sintasa	NM_000961	7,2E-03	2,6	4,1
IL2	interleucina 2	NM_000586	2,5E-03	2,6	34,6
SHC4	Familia SHC (que contiene el dominio de homología 2 de Src), miembro 4	NM_203349	2,2E-03	2,5	11,7
ARHGAP42	Proteína activadora de Rho GTPasa 42	NM_152432	2,1E-03	2,5	2,5

ES 2 816 450 T3

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a BB)	Múltiplo de variación (4h frente a 0h)
<b>IRF8</b>	<b>factor regulador de interferón 8</b>	NM_002163	<b>4,5E-04</b>	<b>2,5</b>	<b>22,7</b>
<b>IL8</b>	<b>interleucina 8</b>	NM_000584	<b>8,8E-04</b>	<b>2,4</b>	<b>9,9</b>
MGAT5	manosil (alfa-1,6-)-glicoproteína beta-1,6-N-acetil-glucosaminiltransferasa	NM_002410	3,7E-06	2,4	1,2
<b>AMIGO2</b>	<b>molécula de adhesión con dominio 2 similar a Ig</b>	NM_001143668	<b>5,6E-06</b>	<b>2,4</b>	<b>2,1</b>
HRH4	receptor de histamina H4	NM_021624	9,8E-03	2,4	1,3
<b>KCNK5</b>	<b>canal de potasio, subfamilia K, miembro 5</b>	NM_003740	<b>2,5E-09</b>	<b>2,3</b>	<b>4,2</b>
<b>ZC3H12C</b>	<b>dedo de zinc tipo CCCH que contiene 12C</b>	NM_033390	<b>1,2E-03</b>	<b>2,3</b>	<b>4,7</b>
<b>PAM</b>	<b>peptidilglicina alfa-amidada monooxigenasa</b>	NM_000919	<b>7,2E-07</b>	<b>2,3</b>	<b>2,8</b>
<b>ZEB2</b>	<b>dedo de zinc E-box de unión a homeobox 2</b>	NM_014795	<b>1,6E-04</b>	<b>2,3</b>	<b>3,4</b>
VCL	vinculina	NM_014000	2,6E-04	2,3	1,7
<b>FAM184A</b>	<b>familia con similitud de secuencia 184, miembro A</b>	NM_024581	<b>2,6E-05</b>	<b>2,3</b>	<b>2,7</b>
<b>TMEM2</b>	<b>proteína transmembrana 2</b>	NM_013390	<b>3,7E-06</b>	<b>2,2</b>	<b>2,7</b>
<b>NIPA1</b>	<b>síndrome de Prader-Willi/Angelman 1 sin impronta</b>	NM_144599	<b>5,6E-05</b>	<b>2,2</b>	<b>4,4</b>
<b>NCEH1</b>	<b>colesterol éster hidrolasa neutra 1</b>	NM_001146276	<b>8,6E-06</b>	<b>2,2</b>	<b>3,0</b>
<b>OTUD1</b>	<b>Dominio OTU que contiene 1</b>	NM_001145373	<b>3,1E-04</b>	<b>2,2</b>	<b>2,8</b>
<b>KBTBD8</b>	<b>repetición kelch y dominio BTB (POZ) que contiene 8</b>	NM_032505	<b>2,5E-05</b>	<b>2,2</b>	<b>4,7</b>
CXCR6	receptor de quimiocina 6 (motivo C-X-C)	NM_006564	4,2E-02	2,2	-1,2
NKG7	secuencia 7 del grupo de células citotóxicas naturales	NM_005601	5,7E-04	2,2	1,2
<b>XCL1</b>	<b>quimiocina (motivo C) ligando 1</b>	NM-002995	<b>2,3E-03</b>	<b>2,2</b>	<b>4,2</b>
<b>NR4A3</b>	<b>subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 3</b>	NM_006981	<b>3,8E-04</b>	<b>2,1</b>	<b>15,8</b>
<b>TNFSF9</b>	<b>superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 9</b>	NM_003811	<b>1,0E-02</b>	<b>2,1</b>	<b>3,8</b>
<b>CCNYL1</b>	<b>ciclina tipo Y 1</b>	NM_001142300	<b>2,9E-05</b>	<b>2,1</b>	<b>2,8</b>
UBASH3B	ubiquitina asociada y dominio SH3 que contiene B	NM_032873	1,3E-05	2,1	1,4
<b>NFKBID</b>	<b>factor nuclear del potenciador génico del polipéptido ligero kappa en el inhibidor de linfocitos B, delta</b>	NM_139239	<b>6,3E-05</b>	<b>2,1</b>	<b>5,4</b>
TBL1X	transducina (beta) similar a 1X ligada	NM_005647	1,1E-06	2,1	1,5
<b>AHI1</b>	<b>transducina (beta) similar a 1X ligada</b>	NM_001134831	<b>1,0E-06</b>	<b>2,1</b>	<b>2,7</b>
<b>PLEK</b>	<b>pleckstrina</b>	NM_002664	<b>1,6E-02</b>	<b>2,1</b>	<b>2,0</b>
EVI2A	sitio de integración vírica ecotrópica 2A	NM_001003927	7,4E-06	2,1	1,5
<b>CCL4</b>	<b>quimiocina (motivo C-C) ligando 4</b>	NM_002984	<b>4,5E-02</b>	<b>2,1</b>	<b>10,1</b>
<b>NCS1</b>	<b>sensor de calcio neuronal 1</b>	NM_014286	<b>1,9E-03</b>	<b>2,1</b>	<b>3,0</b>

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a BB)	Múltiplo de variación (4h frente a 0h)
ANK1	ankirina 1, eritrocítica	NM_020476	9,6E-04	2,1	1,8
<b>CD40LG</b>	<b>Ligando CD40</b>	NM_000074	<b>2,4E-05</b>	<b>2,1</b>	<b>5,4</b>
<b>RILPL2</b>	<b>Rab que interactúa con la proteína lisosómica 2</b>	NM_145058	<b>1,6E-06</b>	<b>2,1</b>	<b>2,5</b>
SLAMF6	Miembro de la familia SLAM 6	NM_001184714	9,6E-05	2,1	1,1
<b>CRIM1</b>	<b>Regulador de BMP transmembrana rico en cisteína 1 (tipo cordina)</b>	NM_016441	<b>1,2E-03</b>	<b>2,1</b>	<b>4,4</b>
SLC4A7	familia de vehículo de solutos 4, cotransportador de bicarbonato de sodio, miembro 7	NM_003615	1,2E-04	2,1	1,4
VAV3	factor de intercambio de nucleótidos de guanina vav 3	NM_006113	7,8E-04	2,1	1,6
KLRK1	subfamilia K del receptor tipo lectina de células citolíticas, miembro 1	NM_007360	6,5E-03	2,1	-1,2
<b>CD200</b>	<b>Molécula CD200</b>	NM_001004196	<b>1,0E-04</b>	<b>2,1</b>	<b>21,1</b>
PIGV	biosíntesis de anclaje de fosfatidilinositol glucano, clase V	NM_017837	2,7E-05	2,1	1,8
<b>IL18RAP</b>	<b>proteína accesoria del receptor de interleucina 18</b>	NM_003853	<b>1,9E-02</b>	<b>2,1</b>	<b>5,3</b>
<b>ZBTB32</b>	<b>dedo de zinc y dominio BTB que contiene 32</b>	NM_014383	<b>1,6E-03</b>	<b>2,0</b>	<b>4,4</b>
<b>CLDN1</b>	<b>claudina 1</b>	NM_021101	<b>1,5E-04</b>	<b>2,0</b>	<b>3,2</b>
<b>IL24</b>	<b>interleucina 24</b>	NM_006850	<b>4,6E-03</b>	<b>2,0</b>	<b>2,5</b>
GPR18	Receptor 18 acoplado a proteínas G	NM_005292	4,1E-05	2,0	1,5
<b>KLHL8</b>	<b>tipo kelch 8 (Drosophila)</b>	NM_020803	<b>8,5E-06</b>	<b>2,0</b>	<b>2,6</b>
ITGA6	integrina, alfa 6	NM_000210	5,4E-04	2,0	-1,1
TIGIT	Inmunorreceptor de linfocitos T con dominios Ig e ITIM	NM_173799	1,9E-03	2,0	1,1

Tabla 2. Genes regulados positivamente de manera diferencial en linfocitos TH17 redirigidos con SS1-ICOSz en comparación con SS1-28z a las 4 horas tras el reconocimiento de antígeno. El perfil de expresión génica se realizó en linfocitos T antes de la activación (día 0) y 4 h tras el reconocimiento de antígeno. Solo se muestran los genes que se regulan positivamente de manera diferencial en las células ICOSz en comparación con las células 28z mediante un cambio > 2 veces que tenía una tasa de falso descubrimiento (TFD) < 0,05. Los genes que mostraron un cambio > 2 veces a las 4 h en comparación con 0 h en el grupo SS1-ICOSz están marcados en negrita.

5

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a BB)	Múltiplo de variación (4h frente a 0h)
<b>IL17A</b>	<b>interleucina 17A</b>	NM_002190	<b>2,3E-03</b>	<b>3,7</b>	<b>15,9</b>
<b>IL17F</b>	<b>interleucina 17F</b>	NM_052872	<b>1,4E-03</b>	<b>3,5</b>	<b>2,7</b>
<b>THBS1</b>	<b>trombospondina 1</b>	NM_003246	<b>1,4E-03</b>	<b>3,3</b>	<b>3,2</b>
<b>TNIP3</b>	<b>proteína 3 de interacción con TNFAIP3</b>	NM_024873	<b>2,4E-02</b>	<b>3,1</b>	<b>8,6</b>
<b>CLDN1</b>	<b>claudina 1</b>	NM_021101	<b>2,4E-05</b>	<b>2,9</b>	<b>3,2</b>
<b>CCL20</b>	<b>quimiocina (motivo C-C) ligando 20</b>	NM_004591	<b>3,9E-02</b>	<b>2,5</b>	<b>12,0</b>
<b>IL1R1</b>	<b>receptor de interleucina 1, tipo I</b>	NM_000877	<b>6,2E-04</b>	<b>2,5</b>	<b>2,9</b>
PGM2L1	fosfoglucomutasa 1 de tipo 2	NM_173582	1,9E-03	2,4	-1,1
SCML1	peine sexual en medio de la pata 1 (Drosophila)	NM_001037540	2,0E-02	2,4	1,4

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a BB)	Múltiplo de variación (4h frente a 0h)
HOOK1	gancho homólogo 1 (Drosophila)	NM_015888	1,2E-03	2,3	1,9
<b>ZNF485</b>	<b>proteína de dedo de zinc 485</b>	NM_145312	<b>6,2E-04</b>	<b>2,3</b>	<b>2,4</b>
VSIG1	Conjunto de V y dominio de inmunoglobulina que contiene 1	NM_001170553	4,7E-02	2,2	-3,9
<b>NIPAL1</b>	<b>Dominio similar a NIPA que contiene 1</b>	NM_207330	<b>7,4E-04</b>	<b>2,2</b>	<b>3,5</b>
<b>FAM184A</b>	<b>familia con similitud de secuencia 184, miembro A</b>	NM_024581	<b>1,8E-03</b>	<b>2,1</b>	<b>2,7</b>
<b>COL6A3</b>	<b>colágeno, tipo VI, alfa 3</b>	NM_004369	<b>2,4E-03</b>	<b>2,1</b>	<b>3,4</b>
<b>XCL2</b>	<b>quimiocina (motivo C) ligando 2</b>	NM_003175	<b>4,6E-02</b>	<b>2,1</b>	<b>10,2</b>
ITGA6	integrina, alfa 6	NM_000210	6,0E-03	2,1	-1,1

Tabla 3. Genes regulados positivamente de manera diferencial en linfocitos  $T_H17$  redirigidos con SS1-ICOSz en comparación con SS1-BBz a las 8 horas tras el reconocimiento de antígeno. El perfil de expresión génica se realizó en linfocitos T antes de la activación (día 0) y 8 h tras el reconocimiento de antígeno. Solo se muestran los genes que se regulan positivamente de manera diferencial en las células ICOSz en comparación con las células BBz mediante un cambio > 2 veces que tenía una tasa de falso descubrimiento (TFD) < 0,05. Los genes que mostraron un cambio > 2 veces a las 8 h en comparación con 0 h en el grupo SS1-ICOSz están marcados en negrita.

5

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a BB)	Múltiplo de variación (4h frente a 0h)
IL17A	interleucina 17A	NM_002190	1,4E-08	10,3	15,9
CD160	Molécula CD160	NM_007053	9,4E-10	7,6	8,8
CCL20	quimiocina (motivo C-C) ligando 20	NM_004591	4,7E-07	7,2	10,7
XCL2	quimiocina (motivo C) ligando 2	NM_003175	8,4E-09	7,2	20,9
IL10	interleucina 10	NM_000572	5,2E-08	6,5	9,3
B3GNT5	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa	NM_032047	7,0E-05	5,1	10,4
IL22	interleucina 22	NM_020525	2,8E-03	5,0	26,5
IL31	interleucina 31	NM_001014336	3,3E-03	4,6	8,3
IL17F	interleucina 17F	NM_052872	4,2E-06	4,5	2,9
TGFBR3	factor de crecimiento transformador, receptor beta III	NM_003243	2,8E-05	3,6	1,6
CRTAM	molécula de linfocito T citotóxico y regulador	NM_019604	2,7E-03	3,4	22,4
ADAM12	ADAM metalopeptidasa dominio 12	NM_003474	1,6E-02	3,3	1,2
NKG7	secuencia 7 del grupo de células citolíticas naturales	NM_005601	4,9E-06	3,0	1,7
FAM102B	familia con similitud de secuencia 102, miembro B	NM_001010883	6,0E-05	2,8	1,3
SLC16A14	familia de vehículo de solutos 16, miembro 14 (transportador de ácido monocarboxílico 14)	NM_152527	5,6E-05	2,7	2,7
UBASH3B	ubiquitina asociada y dominio SH3 que contiene B	NM_032873	1,3E-07	2,7	2,1
IL1R1	receptor de interleucina 1, tipo I	NM_000877	1,4E-05	2,6	2,3
IL24	interleucina 24	NM_006850	3,5E-04	2,5	3,6

ES 2 816 450 T3

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a BB)	Múltiplo de variación (4h frente a 0h)
SIPA1L2	asociada a la proliferación inducida por señal 1 como 2	NM_020808	4,7E-06	2,5	4,4
TAGAP	Proteína activadora de RhoGTPasa de activación de linfocitos T	NM_054114	9,7E-10	2,5	2,9
GPR18	Receptor 18 acoplado a proteínas G	NM_005292	8,7E-07	2,5	2,0
PAM	peptidilglicina alfa-amidada monooxigenasa	NM_000919	1,9E-07	2,5	3,6
IL18RAP	proteína accesoria del receptor de interleucina 18	NM_003853	4,1E-03	2,5	4,3
NCS1	sensor de calcio neuronal	NM_014286	2,6E-04	2,4	3,0
MFSD2A	dominio de superfamilia facilitador principal que contiene 2A	NM_001136493	6,4E-05	2,4	5,5
MGAT5	manosil (alfa-1,6)-glicoproteína beta-1,6-N-acetil-glucosaminiltransferasa	NM_002410	4,2E-06	2,4	-1,0
CDC42EP3	Proteína efectora CDC42 (unión a Rho GTPasa) 3	NM_006449	1,1E-04	2,4	1,2
TIGIT	Inmunorreceptor de linfocitos T con dominios Ig e ITIM	NM_173799	2,4E-04	2,3	1,4
XCL1	quimiocina (motivo C) ligando 1	NM_002995	1,2E-03	2,3	6,1
IL8	interleucina 8	NM_000584	2,6E-03	2,3	5,5
FASLG	Ligando Fas (superfamilia TNF, miembro 6)	NM_000639	2,6E-06	2,2	9,4
GLDC	glicina deshidrogenasa (descarboxilación)	NM_000170	3,9E-02	2,2	2,5
OTUD1	Dominio OTU que contiene 1	NM_001145373	2,7E-04	2,2	1,9
IRF8	factor regulador de interferón 8	NM_002163	2,6E-03	2,2	22,0
KLRK1	subfamilia K del receptor tipo lectina de células citolíticas, miembro 1	NM_007360	4,0E-03	2,2	-1,4
ANK1	ankirina 1, eritrocítica	NM_020476	6,6E-04	2,2	2,3
HRH4	receptor de histamina H4	NM_021624	3,0E-02	2,1	1,0
PLEK	pleckstrina	NM_002664	1,7E-02	2,1	2,3
TBL1X	transducina (beta) similar a 1X ligada	NM_005647	7,4E-07	2,1	1,4
NCR3	receptor 3 desencadenante de citotoxicidad natural	NM_001145466	6,2E-04	2,1	-1,3
NR4A3	subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 3	NM_006981	5,4E-04	2,1	13,5
RIN3	Ras y Rab interactor 3	NM_024832	1,6E-05	2,1	1,2
CFH	factor de complemento H	NM_000186	1,9E-02	2,1	1,0
AMIGO2	molécula de adhesión con dominio 2 similar a Ig	NM_001143668	7,1E-05	2,1	1,6
CD40LG	Ligando CD40	NM_000074	2,7E-05	2,1	4,0
IKZF3	dedo de zinc de la IKAROS 3 (Aiolos)	NM_012481	3,6E-06	2,0	1,5
FABP5	proteína de unión a ácidos grasos 5 (asociada a psoriasis)	NM_001444	2,3E-04	2,0	6,0
CD72	Molécula CD72	NM_001782	7,1E-06	2,0	2,3
FABP5	proteína de unión a ácidos grasos 5 (asociada a	NM_001444	1,9E-04	2,0	5,8

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a BB)	Múltiplo de variación (4h frente a 0h)
	psoriasis)				
PHEX	homólogo de endopeptidasa reguladora de fosfato, ligado a X	NM_000444	1,1E-02	2,0	7,9
HECTD2	Dominio HECT que contiene 2	NM_182765	7,1E-06	2,0	4,4
DACT1	dapper, antagonista de la beta-catenina, homólogo 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )	NM_016651	1,9E-02	2,0	2,4
TMEM2	proteína transmembrana 2	NM_013390	2,4E-05	2,0	2,1
VCL	vinculina	NM_014000	1,8E-03	2,0	1,9
RAB30	RAB30, miembro de la familia oncogénica RAS	NM_014488	9,4E-05	2,0	1,6
FAM113B	familia con similitud de secuencia 113, miembro B	BC008360	2,7E-06	2,0	1,1
HOMER2	homólogo 2 de homer ( <i>Drosophila</i> )	NM_199330	9,0E-03	2,0	1,5

5 **Tabla 4. Genes regulados positivamente de manera diferencial en linfocitos TH17 redirigidos con SS1-ICOSz en comparación con SS1-28z a las 8 horas tras el reconocimiento de antígeno.** El perfil de expresión génica se realizó en linfocitos T antes de la activación (día 0) y 8 h tras el reconocimiento de antígeno. Solo se muestran los genes que se regulan positivamente de manera diferencial en las células ICOSz en comparación con las células 28z mediante un cambio > 2 veces que tenía una tasa de falso descubrimiento (TFD) < 0,05. Los genes que mostraron un cambio > 2 veces a las 8 h en comparación con 0 h en el grupo SS1-ICOSz están marcados en negrita.

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a 28)	Múltiplo de variación (4h frente a 0h)
IL17A	interleucina 17A	NM_002190	5,4E-03	3,5	15,9
IL17F	interleucina 17F	NM_052872	2,0E-03	3,4	2,9
TNIP3	proteína 3 de interacción con TNFAIP3	NM_024873	5,9E-02	2,9	5,6
FAM49A	familia con similitud de secuencia 49, miembro A	NM_030797	1,4E-04	2,7	4,2
CXCL13	quimiocina (motivo C-X-C) ligando 13	NM_006419	7,9E-02	2,4	1,7
IL1R1	receptor de interleucina 1, tipo I	NM_000877	2,0E-03	2,3	2,3
VSIG1	Conjunto de V y dominio de inmunoglobulina que contiene 1	NM_001170553	6,3E-02	2,3	-7,0
NCS1	sensor de calcio neuronal 1	NM_014286	3,6E-02	2,0	3,0

10 **Tabla 5. Genes regulados positivamente de manera diferencial en linfocitos TH17 redirigidos con SS1-ICOSz en comparación con SS1-BBz a las 24 horas tras el reconocimiento de antígeno.** El perfil de expresión génica se realizó en linfocitos T antes de la activación (día 0) y 24 h tras el reconocimiento de antígeno. Solo se muestran los genes que se regulan positivamente de manera diferencial en las células ICOSz en comparación con las células BBz mediante un cambio > 2 veces que tenía una tasa de falso descubrimiento (TFD) < 0,05. Los genes que mostraron un cambio > 2 veces a las 24 h en comparación con 0 h en el grupo SS1-ICOSz están marcados en negrita.

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a BB)	Múltiplo de variación (24h frente a 0h)
IL17A	interleucina 17A	NM_002190	5,3E-07	7,0	11,4

ES 2 816 450 T3

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a BB)	Múltiplo de variación (24h frente a 0h)
B3GNT5	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa 5	NM_032047	3,7E-05	5,8	9,2
TGFBR3	factor de crecimiento transformador, receptor beta III	NM_003243	2,1E-06	4,7	1,6
IL10	interleucina 10	NM_000572	3,2E-06	4,5	7,0
Clorf150	marco de lectura abierto del cromosoma 1 150	ENST00000366488	1,2E-10	4,3	4,9
CCL20	quimiocina (motivo C-C) ligando 20	NM_004591	1,2E-03	3,2	5,3
TIGIT	Inmunorreceptor de linfocitos T con dominios Ig e ITIM	NM_173799	5,6E-06	3,1	2,0
ACTG2	actina, gamma 2, músculo liso, entérico	NM_001615	1,5E-07	3,0	3,3
KLRK1	subfamilia K del receptor tipo lectina de células citolíticas, miembro 1	NM_007360	1,3E-04	3,0	-1,0
DKFZ p686O24166	proteína hipotética DKFZp686O24166	NR_026750	7,4E-06	2,8	3,5
RAB38	RAB38, miembro de la familia oncogénica RAS	NM_022337	1,2E-05	2,7	2,8
PLK2	quinasa tipo polo 2	NM_006622	9,1E-05	2,6	6,3
NCS1	sensor de calcio neuronal 1	NM_014286	2,4E-04	2,5	2,2
UBASH3B	ubiquitina asociada y dominio SH3 que contiene B	NM_032873	8,7E-07	2,5	2,2
IL22	interleucina 22	NM_020525	1,4E-01	2,5	9,4
FAM102B	familia con similitud de secuencia 102, miembro B	NM_001010883	4,6E-04	2,5	1,0
SNORD12C	ARN nucleolar pequeño, C/D box 12C	NR_002433	8,6E-06	2,4	3,7
NKG7	secuencia 7 del grupo de células citolíticas naturales	NM_005601	1,7E-04	2,4	2,2
IL17F	interleucina 17F	NM_052872	4,3E-03	2,4	1,4
MYO1E	miosina IE	NM_004998	9,9E-05	2,4	3,8
DTHD1	dominio de muerte que contiene 1	NM_001136536	4,8E-04	2,4	1,7
NCR3	receptor 3 desencadenante de citotoxicidad natural	NM_001145466	1,5E-04	2,4	1,2
IL18RAP	proteína accesoria del receptor de interleucina 18	NM_003853	7,1E-03	2,4	3,6
CTSL1	cathepsina L1	NM_001912	5,1E-04	2,3	-2,8
XCL2	quimiocina (motivo C) ligando 2	NM_003175	3,2E-03	2,3	13,3
SNORD50B	ARN nucleolar pequeño, C/D box 50B	NR_003044	3,7E-05	2,3	2,8
ATP8B4	ATPasa, clase I, tipo 8B, miembro 4	NM_024837	5,5E-03	2,3	2,5
CFH	factor de complemento H	NM_000186	1,1E-02	2,2	1,2
CD160	Molécula CD160	NM_007053	2,6E-03	2,2	2,2
PMP22	proteína de mielina periférica 22	NM_000304	5,3E-02	2,2	5,9
QPCT	glutaminil-péptido ciclotransferasa	NM_012413	4,6E-05	2,2	2,5
CCR4	receptor 4 de quimiocina (motivo C-C)	NM_005508	4,0E-05	2,2	-1,2
KLHL11	tipo kelch 11 (Drosophila)	NM_018143	1,4E-08	2,1	3,1

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a BB)	Múltiplo de variación (24h frente a 0h)
TBL1X	transducina (beta) similar a 1X ligada	NM_005647	1,0E-06	2,1	-1,1
LAX1	adaptador transmembrana de linfocitos 1	NM_017773	4,6E-06	2,1	-1,0
ASB2	repetición de anquirina y box SOCS que contiene 2	NM_016150	2,6E-02	2,1	-1,3
SNORD77	ARN nucleolar pequeño, C/D box 77	NR_003943	6,3E-03	2,1	4,4
IL8	interleucina 8	NM_000584	8,7E-03	2,1	2,2
IL18R1	receptor de interleucina 18 1	NM_003855	5,3E-03	2,0	4,0
TMEM2	proteína transmembrana 2	NM_013390	2,6E-05	2,0	1,8
PIK3CG	fosfoinositida-3-quinasa, catalítico, polipéptido gamma	NM_002649	1,1E-08	2,0	-1,0
C7orf68	marco de lectura abierto del cromosoma 7 68	NM_013332	1,6E-03	2,0	2,9
CTLA4	proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos	NM_005214	1,9E-04	2,0	1,3
LGMM	legumaina	NM_005606	6,2E-03	2,0	-4,0
TMEM99	proteína transmembrana 99	NM_145274	5,4E-07	2,0	3,0

5 **Tabla 6. Genes regulados positivamente de manera diferencial en linfocitos TH17 redirigidos con SS1-ICOSz en comparación con SS1-28z a las 24 horas tras el reconocimiento de antígeno.** El perfil de expresión génica se realizó en linfocitos T antes de la activación (día 0) y 24 h tras el reconocimiento de antígeno. Solo se muestran los genes que se regulan positivamente de manera diferencial en las células ICOSz en comparación con las células 28z mediante un cambio > 2 veces que tenía una tasa de falso descubrimiento (TFD) < 0,05. Los genes que mostraron un cambio > 2 veces a las 24 h en comparación con 0 h en el grupo SS1-ICOSz están marcados en negrita.

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a 28)	Múltiplo de variación (4h frente a 0h)
IL17A	interleucina 17A	NM_002190	8,4E-04	4,5	15,9
IL17F	interleucina 17F	NM_052872	8,5E-03	3,0	2,9
Clorf150	marco de lectura abierto del cromosoma 1 150	ENST00000366488	2,6E-06	2,9	1,3
KLRK1	subfamilia K del receptor tipo lectina de células citolíticas, miembro 1	NM_007360	9,9E-03	2,6	-1,4
ACTG2	actina, gamma 2, músculo liso, entérico	NM_001615	5,6E-04	2,3	1,4

10 **Tabla 7. Genes regulados positivamente de manera diferencial en linfocitos TH17 redirigidos con SS1-ICOSz en comparación con SS1-BBz a las 96 horas tras el reconocimiento de antígeno.** El perfil de expresión génica se realizó en linfocitos T antes de la activación (día 0) y 96 h tras el reconocimiento de antígeno. Solo se muestran los genes que se regulan positivamente de manera diferencial en las células ICOSz en comparación con las células BBz mediante un cambio > 2 veces que tenía una tasa de falso descubrimiento (TFD) < 0,05. Los genes que mostraron un cambio > 2 veces a las 96 h en comparación con 0 h en el grupo SS1-ICOSz están marcados en negrita.

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a BB)	Múltiplo de variación (96h frente a 0h)
GPR15	Receptor 15 acoplado a proteínas G	NM_005290	5,4E-05	5,5	1,9
SLAMF7	Miembro de la familia SLAM 7	NM_021181	1,4E-09	5,3	2,6
ASB2	repetición de anquirina y box SOCS que contiene 2	NM_016150	2,0E-06	5,1	1,5

ES 2 816 450 T3

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a BB)	Múltiplo de variación (96h frente a 0h)
KLRB1	subfamilia B del receptor tipo lectina de células citolíticas, miembro 1	NM_002258	2,1E-03	4,5	1,0
KLRK1	subfamilia K del receptor tipo lectina de células citolíticas, miembro 1	NM_007360	3,0E-06	3,9	2,2
TIGIT	Inmunorreceptor de linfocitos T con dominios Ig e ITIM	NM_173799	2,3E-07	3,8	3,0
FGFR1	receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos	NM_023110	2,5E-10	3,8	3,5
METTL7A	metiltransferasa tipo 7A	NM_014033	5,9E-08	3,8	3,7
CD86	Molécula CD86	NM_175862	1,1E-05	3,5	2,3
CEP70	proteína centrosómica de 70kDa	NM_024491	4,5E-07	3,2	2,3
HPGD	hidroxiprostaglandina deshidrogenasa 15-(NAD)	NM_000860	5,7E-03	3,1	1,8
PYHIN1	familia de dominios de pirina y HIN, miembro 1	NM_152501	2,2E-09	2,9	1,1
F2R	receptor del factor de coagulación II (trombina)	NM_001992	8,4E-04	2,9	1,5
RNF125	proteína del dedo anular 125	NM_017831	4,6E-07	2,8	-1,1
SLCO4C1	familia de transportadores de aniones orgánicos de vehículos de solutos, miembro 4C1	AF119865	1,2E-03	2,8	1,1
RASGRP3	proteína liberadora de guanilo RAS 3 (regulada por calcio y DAG)	NM_170672	8,4E-03	2,8	1,8
FAIM3	molécula inhibidora apoptótica Fas 3	NM_005449	1,4E-05	2,7	-1,6
NMT2	N-miristoiltransferasa 2	NM_004808	4,6E-05	2,7	1,2
CABLES1	sustrato de enzima Cdk5 y Ab1 1	NM_138375	4,7E-07	2,7	2,3
RGS9	regulador 9 de señalización de proteína G	NM_003835	2,8E-05	2,7	1,8
PDLIM1	PDZ y LIM dominio 1	NM_020992	1,1E-03	2,7	2,5
VNN2	vanina 2	NM_004665	1,5E-06	2,6	2,1
CECR1	región cromosómica del síndrome del ojo de gato, candidato 1	NM_017424	1,2E-05	2,6	-1,4
VSIG1	Conjunto de V y dominio de inmunoglobulina que contiene 1	NM_001170553	1,3E-03	2,6	-4,3
P2RX5	receptor purinérgico P2X, canal iónico dependiente de ligando, 5	NM_002561	3,4E-06	2,5	2,3
SLC12A7	familia de portadores de solutos 12 (transportadores de potasio/cloruro), miembro 7	NM_006598	2,5E-06	2,5	-1,2
PION	homólogo de pigeon (Drosophila)	NM_017439	1,1E-04	2,5	1,1
UBASH3B	ubiquitina asociada y dominio SH3 que contiene B	NM_032873	6,2E-07	2,5	1,5
LY9	antígeno linfocitario 9	NM_002348	1,3E-06	2,5	-2,0
DTHD1	dominio de muerte que contiene 1	NM_001136536	2,0E-04	2,4	9,2
PTPLAD2	dominio A tipo proteína tirosina fosfatasa que contiene 2	NM_001010915	8,9E-08	2,4	1,1

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a BB)	Múltiplo de variación (96h frente a 0h)
SUSD1	dominio de sushi que contiene 1	NM_022486	2,3E-09	2,4	-1,5
HSH2D	dominio SH2 hematopoyético que contiene	NM_032855	3,5E-04	2,4	3,2
CD244	molécula CD244, receptor de células citolíticas naturales 2B4	NM_016382	1,4E-03	2,4	1,3
SORL1	receptor relacionado con la sortilina, L (clase DLR) que contiene repeticiones A	NM_003105	2,2E-05	2,3	-1,3
PDP1	piruvato deshidrogenasa fosfatasa subunidad catalítica 1	NM_001161778	2,5E-09	2,3	-1,2
TGFBR3	factor de crecimiento transformador, receptor beta III	NM_003243	3,7E-03	2,3	-1,2
GALNT3	UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3)	NM_004482	5,2E-06	2,3	2,0
TOX	grupo box de alta movilidad asociada a la selección de timocitos	NM_014729	2,1E-05	2,2	1,3
CXCR6	receptor de quimiocina 6 (motivo C-X-C)	NM_006564	3,6E-02	2,2	-1,5
FAR2	acil CoA reductasa 2 grasa	NM_018099	6,2E-06	2,2	-1,2
IL9R	receptor de interleucina 9	NR_024033	4,6E-07	2,1	1,4
DAAM1	activador desaliñado asociado de morfogénesis 1	NM_014992	1,3E-04	2,1	-1,3
RASGRP2	proteína liberadora de guanilo RAS 2 (regulada por calcio y DAG)	NM_001098671	3,9E-08	2,1	-1,8
TCEA3	factor de elongación de la transcripción A (SII), 3	NM_003196	5,3E-04	2,1	1,9
GIMAP7	GTPasa, Miembro de la familia IMAP 7	NM_153236	3,9E-04	2,1	-1,2
MYO1F	miosina IF	NM_012335	9,6E-07	2,1	-1,2
TBL1X	transducina (beta) similar a 1X ligada	NM_005647	1,3E-06	2,1	-1,4
SLCO3A1	familia de transportadores de aniones orgánicos de vehículos de solutos, miembro 3A1	NM_013272	1,7E-06	2,1	-1,9
LZTFL1	factor de transcripción de cremallera de leucina de tipo 1	NM_020347	2,6E-02	2,1	-1,1
LOC283588	hipotético LOC283588	AK095276	2,4E-05	2,0	1,2
HIST1H2AJ	grupo de histonas 1, H2aj	NM_021066	1,4E-02	2,0	-1,0
CCR4	receptor 4 de quimiocina (motivo C-C)	NM_005508	8,0E-05	2,0	-1,7
HIP1	proteína 1 de interacción con huntingtina	NM_005338	6,4E-06	2,0	1,4
AOAH	aciloxiacil hidrolasa (neutrófilo)	NM_001637	3,8E-03	2,0	3,5

Tabla 8. Genes regulados positivamente de manera diferencial en linfocitos TH17 redirigidos con SS1-ICOSz en comparación con SS1-28z a las 96 horas tras el reconocimiento de antígeno. El perfil de expresión génica se realizó en linfocitos T antes de la activación (día 0) y 96 h tras el reconocimiento de antígeno. Solo se muestran los genes que se regulan positivamente de manera diferencial en las células ICOSz en comparación con las células 28z mediante un cambio > 2 veces que tenía una tasa de falso descubrimiento (TFD) < 0,05. Los genes que mostraron un cambio > 2 veces a las 96 h en comparación con 0 h en el grupo SS1-ICOSz están marcados en negra.

5

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a 28)	Múltiplo de variación (96h frente a 0h)
KLRK1	subfamilia K del receptor tipo lectina de células citolíticas, miembro 1	NM_007360	2,0E-07	5,7	2,2
KLRB1	subfamilia B del receptor tipo lectina de células citolíticas, miembro 1	NM_002258	6,3E-03	4,1	1,0
VSIG1	Conjunto de V y dominio de inmunoglobulina que contiene 1	NM_001170553	3,7E-04	3,1	-4,3
PTPN13	proteína tirosina fosfatasa, no receptor tipo 13 (fosfatasa asociada a (Fas) APO-1/CD95)	NM_080683	2,9E-02	2,9	-1,0
DTHD1	dominio de muerte que contiene 1	NM_001136536	4,0E-05	2,9	9,2
SLCO4C1	familia de transportadores de aniones orgánicos de vehículos de solutos, miembro 4C1	AF119865	2,4E-03	2,8	1,1
GNG4	proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), gamma 4	NM_001098721	7,4E-05	2,6	3,3
CEP68	proteína centrosómica de 68kDa	NM_015147	1,2E-06	2,4	1,5
CD244	molécula CD244, receptor de células citolíticas naturales 2B4	NM_016382	2,0E-03	2,4	1,3
METTL7A	metiltransferasa tipo 7A	NM_014033	1,4E-04	2,3	3,7
C6orf105	marco de lectura abierto del cromosoma 6 105	NM_001143948	1,8E-03	2,3	2,5
CXCL13	quimiocina (motivo C-X-C) ligando 13	NM_006419	1,9E-02	2,3	2,9
IPCEF1	proteína de interacción para factores de intercambio de citohesina 1	NM_001130700	3,4E-04	2,3	-1,5
TCF7	factor de transcripción 7 (específico de linfocitos T, HMG-box)	NM_003202	1,2E-03	2,3	-1,3
KLRC1	subfamilia C del receptor tipo lectina de células citolíticas, miembro 1	NM_213658	2,8E-03	2,3	1,9
CHRNA6	receptor colinérgico, nicotínico, alfa 6	NM_004198	3,2E-04	2,3	2,4
GPA33	glicoproteína A33 (transmembrana)	NM_005814	8,3E-04	2,2	-1,5
LY9	antígeno linfocitario 9	NM_002348	2,3E-05	2,2	-2,0
TXNIP	proteína de interacción con tiorredoxina	NM_006472	3,9E-06	2,2	1,1
GLIPR1	GLI relacionada con la patogénesis 1	NM_006851	7,0E-06	2,2	-1,3
FAIM3	molécula inhibidora apoptótica Fas 3	NM_005449	7,5E-04	2,1	-1,6
CCL20	quimiocina (motivo C-C) ligando 20	NM_004591	4,1E-02	2,1	-1,5
TMEM45B	proteína transmembrana 45B	NM_138788	1,3E-05	2,1	-1,3
GPR155	Receptor 155 acoplado a proteínas G	NM_001033045	2,4E-02	2,1	-1,4

Gen	Nombre del gen	GeneBank	Valor p	Múltiplo de variación (ICOS frente a 28)	Múltiplo de variación (96h frente a 0h)
GLCC11	transcripción inducida por glucocorticoides 1	NM_138426	7,6E-07	2,1	1,2
ABCB1	casete de unión a ATP, sub-familia B (MDR/TAP), miembro 1	NM_000927	4,2E-03	2,1	-1,2
IKZF2	dedo de zinc de la familia IKAROS 2 (Helios)	NM_016260	1,7E-03	2,0	1,0
SCML4	peine sexual en medio de la pata 4 (Drosophila)	NM_198081	2,2E-04	2,0	-1,4
PIK3IP1	fosfoinositida-3-quinasa que interactúa con la proteína 1	NM_052880	6,3E-04	2,0	-2,1

La incorporación del dominio de señalización ICOS en los linfocitos T con CAR imparte nuevas funciones en comparación con los CAR que codifican los dominios de señalización CD28 o 4-1BB. Los estudios presentados en el presente documento indican que la redirección de las células Th17 con un CAR que codifica el dominio intracelular ICOS es crítica para obtener linfocitos Th17 potentes con función y persistencia mejoradas. Además, los datos presentados en el presente documento demuestran que la inclusión del dominio ICOS reduce la cantidad de IL-2 liberada, lo cual se prefiere porque entonces el CAR no desencadena la proliferación de linfocitos T reguladores. El diseño de nuevos CAR basados en ICOS tiene el potencial de aumentar los efectos antitumorales en ensayos clínicos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Trustees of University of Pennsylvania

<120> USO DE CAR BASADOS EN ICOS PARA MEJORAR LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y LA PERSISTENCIA DEL CAR

<130> EP95053HVpau

<140> 13751777.7  
<141> 22-02-2013

<150> PCT/US2013/027366  
<151> 22-02-2013

<150> US 61/601,910  
<151> 22-02-2012

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 1184  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintetizado químicamente

<400> 1

ES 2 816 450 T3

cgtgaggctc cggtgcccgt cagtgggcag agcgcacatc gcccacagtc cccgagaagt 60  
 tggggggagg ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaactggg 120  
 aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccagggg tgggggagaa ccgtatataa 180  
 gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacggggtt tgccgccaga acacaggtaa 240  
 gtgccgtgtg tggttcccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggccct tgcgtgcctt 300  
 gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg 360  
 ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagccccttc gcctcgtgct tgagttgagg 420  
 cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg 480  
 ctgctttcga taagtctcta gccatttaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt 540  
 tctggcaaga tagtcttga aatgcgggcc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg 600  
 gggccgcggg cggcgacggg gcccgctgct cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc 660  
 tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg 720  
 tgcctggcct cgcgccgcgg tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780  
 caccagttgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat 840  
 ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggagg gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct 900  
 ttccgtcctc agccgtcgtc tcatgtgact ccacggagta ccgggcgcgg tccaggcacc 960  
  
 tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggttttatg 1020  
 cgatggagtt tcccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080  
 tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttgatc ttggttcatt ctcaagcctc 1140  
 agacagtggg tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgtc gtga 1184

5 <210> 2  
 <211> 63  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 2

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccg 63

15  
 20 <210> 3  
 <211> 720  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintetizado químicamente

25 <400> 3

ES 2 816 450 T3

caggtacaac tgcagcagtc tgggcctgag ctggagaagc ctggcgcttc agtgaagata 60  
 tcctgcaagg cttctgggta ctcatcact ggctacacca tgaactgggt gaagcagagc 120  
 catggaaaga gccttgagtg gattggactt attactcctt acaatgggtc ttctagctac 180  
 aaccagaagt tcaggggcaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac 240  
 atggacctcc tcagtctgac atctgaagac tctgcagtct atttctgtgc aagggggggt 300  
 tacgacggga ggggttttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctctcaggt 360  
 ggagggcgggt caggcggcgg tggctctagc ggtggcggat cggacatcga gctcactcag 420  
 tctccagcaa tcatgtctgc atctccaggg gagaaggtca ccatgacctg cagtgccagc 480  
 tcaagtgtaa gttacatgca ctggtaccag cagaagtcag gcacctcccc caaaagatgg 540  
 atttatgaca catccaaact ggcttctgga gtcccaggtc gcttcagtgg cagtgggtct 600  
 ggaaactctt actctctcac aatcagcagc gtggaggctg aagatgatgc aacttattac 660  
 tgccagcagt ggagtaagca ccctctcacg tacggtgctg ggacaaagtt ggaaatcaaa 720

5 <210> 4  
 <211> 135  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintetizado químicamente  
 <400> 4

accacgacgc cagcgcgcgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg 60  
 tccttgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120  
 gacttcgcct gtgat 135

15 <210> 5  
 <211> 72  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintetizado químicamente  
 <400> 5

ttctggttac ccataggatg tgcagccttt gttgtagtct gcattttggg atgcatactt 60  
 atttgttggc tt 72

30 <210> 6  
 <211> 105  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Sintetizado químicamente  
 <400> 6

# ES 2 816 450 T3

acaaaaaaga agtattcatc cagtgtgcac gaccctaacg gtgaatacat gttcatgaga 60  
 gcagtgaaca cagccaaaaa atccagactc acagatgtga cccta 105

5 <210> 7  
 <211> 336  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintetizado químicamente  
 <400> 7

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc 60  
 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120  
 cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180  
 gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240  
 cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggctctca gtacagccac caaggacacc 300  
 tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

15 <210> 8  
 <211> 1455  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintetizado químicamente  
 <400> 8

ES 2 816 450 T3

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60  
 ccgggatccc aggtacaact gcagcagtct gggcctgagc tggagaagcc tggcgcttca 120  
 gtgaagatat cctgcaaggc ttctggttac tcattcactg gctacaccat gaactgggtg 180  
 aagcagagcc atggaagag ccttgagtgg attggactta ttactcctta caatggtgct 240  
 tctagctaca accagaagtt caggggcaag gccacattaa ctgtagacia gtcatccagc 300  
 acagcctaca tggacctcct cagtctgaca tctgaagact ctgcagtcta tttctgtgca 360  
 aggggggggtt acgacgggag gggttttgac tactggggcc aagggaccac ggtcacccgtc 420  
 tcctcaggtg gaggcgggtc aggcggcggg ggctctagcg gtggcggatc ggacatcgag 480  
 ctcactcagt ctccagcaat catgtctgca tctccagggg agaaggtcac catgacctgc 540  
 agtgccagct caagtgtaag ttacatgcac tggtagcagc agaagtcagg cacctcccc 600  
 aaaagatgga tttatgacac atccaaactg gcttctggag tcccaggtcg cttcagtggc 660  
 agtgggtctg gaaactctta ctctctcaca atcagcagcg tggaggctga agatgatgca 720  
 acttattact gccagcagtg gagtaagcac cctctcacgt acggtgctgg gacaaagttg 780  
 gaaatcaaag ctagcaccac gacgccagcg ccgcgaccac caacaccggc gccccaccatc 840  
 gcgtcgcagc ccctgtccct gcgcccagag gcgtgcccgc cagcggcggg gggcgcagtg 900  
 cacacgaggg ggctggactt cgcctgtgat ttcgaattct ggttaccatc aggatgtgca 960  
 gcctttgttg tagtctgcat tttgggatgc atacttattt gttggcttac aaaaaagaag 1020  
 tattcatcca gtgtgcacga ccctaacggg gaatacatgt tcatgagagc agtgaacaca 1080  
 gccaaaaaat ccagactcac agatgtgacc ctaactagta gagtgaagtt cagcaggagc 1140  
 gcagacgccc ccgcgtacaa gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga 1200  
 cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga 1260  
 aagccgagaa ggaagaacct tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg 1320  
 gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat 1380  
 ggcttttacc aggtctcag tacagccacc aaggacacct acgacgccct tcacatgcag 1440  
 gccctgcccc ctgc 1455

<210> 9  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Sintetizado químicamente

10

<400> 9

ES 2 816 450 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro  
 20

<210> 10  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 10

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125

Ser Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
 130 135 140

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser  
 145 150 155 160

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser

ES 2 816 450 T3

165

170

175

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro  
180 185 190

Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
195 200 205

Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
210 215 220

Ser Lys His Pro Leu Thr Tyr Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
225 230 235 240

5 <210> 11  
<211> 45  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintetizado químicamente  
<400> 11

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala  
1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly  
20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp  
35 40 45

15 <210> 12  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Sintetizado químicamente  
<400> 12

Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu  
1 5 10 15

25 Gly Cys Ile Leu Ile Cys Trp Leu  
20

30 <210> 13  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

ES 2 816 450 T3

<220>

<223> Sintetizado químicamente

5 <400> 13

Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr  
1 5 10 15

Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp  
20 25 30

Val Thr Leu  
35

<210> 14

10 <211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Sintetizado químicamente

<400> 14

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly  
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala  
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
100 105 110

20

<210> 15

<211> 485

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Sintetizado químicamente

ES 2 816 450 T3

<400> 15

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro  
 20 25 30

Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser  
 35 40 45

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His  
 50 55 60

Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala  
 65 70 75 80

Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp  
 85 90 95

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu  
 100 105 110

Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly  
 115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly  
 130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu  
 145 150 155 160

Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val  
 165 170 175

Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr  
 180 185 190

Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser  
 195 200 205

Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 210 215 220

Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Asp Ala  
 225 230 235 240

ES 2 816 450 T3

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr Tyr Gly Ala  
 245 250 255

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg  
 260 265 270

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg  
 275 280 285

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly  
 290 295 300

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Glu Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala  
 305 310 315 320

Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu Ile Cys Trp Leu  
 325 330 335

Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr  
 340 345 350

Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp  
 355 360 365

Val Thr Leu Thr Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro  
 370 375 380

Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly  
 385 390 395 400

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro  
 405 410 415

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr  
 420 425 430

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly  
 435 440 445

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln  
 450 455 460

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln  
 465 470 475 480

Ala Leu Pro Pro Arg  
 485

ES 2 816 450 T3

<210> 16  
 <211> 2651  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintetizado químicamente  
  
 10 <400> 16  
  
 cgtgaggctc cggcgcccgt cagtgggcag agcgcacatc gcccacagtc cccgagaagt 60  
 tgggggggag ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaactggg 120  
 aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccgaggg tgggggagaa ccgtatataa 180  
 gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacggggt tgccgccaga acacaggtaa 240  
 gtgccgtgtg tggttcccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggccct tgcgtgcctt 300  
 gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg 360  
 ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagccccttc gcctcgtgct tgagttgagg 420  
 cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg 480  
 ctgctttcga taagtctcta gccatttaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt 540  
 tctggcaaga tagtcttgta aatgcgggcc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg 600  
 gggccgcggg cggcgacggg gcccgctgct cccagcgcac atggtcggcg aggcggggcc 660  
 tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg 720  
 tgcctggcct cgcgcccggc tgtatcggcc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780  
 caccagttgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat 840  
 ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct 900  
 ttccgtcctc agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccc tccaggcacc 960  
 tcgattagtt ctogtgcttt tggagtacgt cgtcttttag ttggggggag gggttttatg 1020  
 cgatggagtt tcccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080  
 tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttgatc ttggttcatt ctcaagcctc 1140  
 agacagtggg tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgtc gtgagctagc tctagaatgg 1200  
 ccttaccagt gaccgccttg ctctgcccgc tggccttgct gctccacgcc gccaggccgg 1260  
 gatcccaggt acaactgcag cagtctgggc ctgagctgga gaagcctggc gcttcagtga 1320  
 agatatcctg caaggcttct ggttactcat tcaactggcta caccatgaac tgggtgaagc 1380  
 agagccatgg aaagagcctt gagtggattg gacttattac tccttacaat ggtgcttcta 1440  
 gctacaacca gaagttcagg ggcaaggcca cattaactgt agacaagtca tccagcacag 1500  
 cctacatgga cctcctcagt ctgacatctg aagactctgc agtctatttc tgtgcaaggg 1560  
 ggggttacga cgggaggggt tttgactact ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct 1620

ES 2 816 450 T3

cagggtggagg cggttcaggc ggcggtggct ctagcgggtgg cggatcggac atcgagctca 1680  
 ctcagtctcc agcaatcatg tctgcatctc caggggagaa ggtcaccatg acctgcagtg 1740  
 ccagctcaag tgtaagttac atgcaactggt accagcagaa gtcaggcacc tccccaaaa 1800  
 gatggattta tgacacatcc aaactggctt ctggagtccc aggtcgcttc agtggcagtg 1860  
 ggtctggaag ctcttactct ctcaaatca gcagcgtgga ggctgaagat gatgcaactt 1920  
 attactgccca gcagtggagt aagcacctc tcacgtacgg tgctgggaca aagttggaaa 1980  
 tcaaagctag caccacgacg ccagcgcgcg gaccaccaac accggcgccc accatcgctg 2040  
 cgcagcccct gtccctgcgc ccagagcgt gccggccagc ggcggggggc gcagtgcaca 2100  
 cgagggggct ggacttcgcc tgtgatttcg aattctggtt acctatagga tgtgcagcct 2160  
 ttggtgtagt ctgcattttg ggatgcatac ttatttggtt gcttcaaaa aagaagtatt 2220  
 catccagtgt gcacgaccct aacggtgaat acatgttcat gagagcagtg aacacagcca 2280  
 aaaaatccag actcacagat gtgaccctaa ctagtagagt gaagttcagc aggagcgcag 2340  
 acgccccgc gtacaagcag ggcagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa 2400  
 gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc 2460  
 cgagaaggaa gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg 2520  
 aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcggcgag gggcaagggg cacgatggcc 2580  
 tttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgccttcac atgcaggccc 2640  
 tgccccctcg c 2651

**REIVINDICACIONES**

1. Una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular ICOS, en donde dicho dominio ICOS está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6.
2. Una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular ICOS, en donde dicho dominio ICOS está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, en donde la célula se selecciona del grupo que consiste en un linfocito Th17 y un linfocito Tc17.
3. Una célula modificada genéticamente para que exprese un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular ICOS, en donde dicho dominio ICOS está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, en donde la célula se selecciona del grupo que consiste en un linfocito Th17 y un linfocito Tc17, para su uso en un método de
- a) estimular una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T a una población celular o tejido diana en el mamífero, comprendiendo el método administrar a un mamífero una cantidad eficaz de la célula modificada genéticamente para expresar un CAR;
- b) proporcionar una inmunidad antitumoral en un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR, proporcionando así una inmunidad antitumoral en el mamífero; o
- c) tratar a un mamífero que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociada con una expresión elevada de un antígeno tumoral, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR, tratando así al animal.
4. Una célula diseñada genéticamente para que exprese un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular ICOS, en donde dicho dominio ICOS está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, en donde la célula se selecciona del grupo que consiste en un linfocito Th17 y un linfocito Tc17, para su uso en un método de
- a) tratar a un ser humano con cáncer, comprendiendo el método administrar al ser humano una célula modificada genéticamente para expresar un CAR;
- b) generar una población persistente de linfocitos T genéticamente modificados en un ser humano diagnosticado con cáncer, comprendiendo el método administrar al ser humano una célula modificada genéticamente para que exprese un CAR, en donde la población persistente de células modificadas genéticamente persiste en el ser humano durante al menos un mes después de la administración; o
- c) expandir una población de linfocitos T genéticamente modificados en un ser humano diagnosticado con cáncer, comprendiendo el método administrar al ser humano una célula modificada genéticamente para que exprese un CAR, además, en el que la célula administrada genéticamente modificada produce una población de progenie de linfocitos T en el ser humano.
5. La secuencia de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, la célula de la reivindicación 2, la célula genéticamente modificada para su uso como en la reivindicación 3, o la célula diseñada genéticamente para su uso como en la reivindicación 4, en donde el CAR comprende además un dominio de señalización de CD3zeta.
6. La secuencia de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 o la célula de la reivindicación 2 que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 8.
7. La secuencia de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 o la célula de la reivindicación 2, en donde el dominio de unión a antígeno es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
8. La secuencia de ácido nucleico aislada o la célula de la reivindicación 7, en donde el fragmento de unión a antígeno es un Fab o un scFv.
9. La secuencia de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 o la célula de la reivindicación 2, en donde el dominio de unión a antígeno se une a un antígeno tumoral.
10. La secuencia de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 o la célula de la reivindicación 2, en donde el CAR comprende además una región de señalización coestimuladora que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y cualquier combinación

de los mismos.

- 5 11. La secuencia de ácido nucleico aislada o la célula de la reivindicación 5, en donde el dominio de señalización de CD3 zeta está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 7.
12. La célula de la reivindicación 2, en donde la célula presenta una propiedad antitumoral cuando el dominio de unión a antígeno se une a su antígeno correspondiente.
- 10 13. La célula genéticamente modificada para su uso como en la reivindicación 3(c), en donde la célula es una célula autóloga.
14. La célula genéticamente modificada para su uso como en la reivindicación 4(a), en donde el ser humano es resistente a al menos un agente quimioterapéutico.
- 15 15. La célula genéticamente modificada para su uso como en la reivindicación 4(b), en donde la población persistente de linfocitos T genéticamente modificados
- 20 • comprende al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula que se administró al ser humano, una progenie de una célula que se administró al ser humano, y una combinación de las mismas;
  - comprende un linfocito T de memoria; o
  - 25 • persiste en el ser humano durante al menos tres meses después de la administración, o cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, dos años o tres años después de la administración.
16. La célula genéticamente modificada para su uso como en la reivindicación 4(c), en donde los linfocitos T de la progenie en el ser humano comprenden un linfocito T de memoria.
- 30 17. La célula genéticamente modificada para su uso como en la reivindicación 4(c), en donde la célula es una célula autóloga.
18. La célula genéticamente modificada para su uso como en la reivindicación 4(c), en donde la población de la progenie de linfocitos T persiste en el ser humano durante al menos tres meses después de la administración, o 35 cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, dos años o tres años después de la administración.
19. La célula genéticamente modificada para su uso como en las reivindicaciones 4(b) o 4(c), en donde dicho método es un método para tratar el cáncer.
- 40

Figura 1

CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCACTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGA-  
 AGTTGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTA-  
 AACTGGGAAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGA-  
 ACCGTATAAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCCGCAACGGGTTTGGCGC-  
 CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGT-  
 TATGGCCCTTGGCTGCCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCC-  
 GAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCCTTGGCTTAAGGAGCCCTTC-  
 GCCTCGTGCTTGAAGTGGGCTGGCCGGGCGCTGGGGCCGCGCGCTGCGAATCTG-  
 GTGGCACCTTCGCGCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTT-  
 GATGACCTGTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAA-  
 GATCTGCACACTGGTATTTCCGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCACGGGGCCCGTGC-  
 GTCCAGCGCACATGTTCCGGCAGGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCG-  
 GACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCGGGCTGCTCTGGTGCCGGCTCGCGCCGCCGT-  
 GTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGGCCACCAGTTGCGTGAGC-  
 GGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCGAGGAGCTCAAAATGGAGGACGCG-  
 GCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGTAGTCAACACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCC-  
 GTCCTCAGCCGTGCTTCAATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCGTCCAGGCACCT-  
 GATTAGTTCTCGTGCTTTTGGAGTACGTCTCTTAGGTGGGGGGAGGGTTTTAT-  
 GCGATGGAGTTTCCCACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTG-  
 GCCATTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCACTT-  
 CAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTTACAGGTGTCTGTA  
 GCTAGCTCTAGAATGGCCTTACCAAGTGACCGCCTTGGCTCCTGCCGCTGGCCTTGGT-  
 GCTCCACGCGCCAGGGCCGGGATCCCAGGTACAAGTGCAGCAGTCTGGGCCT-  
 GAGCTGGAGAAAGCCTGGCGCTTCAAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTG-  
 GTTACTCAATCACTGGCTACACCATGAAC TGGGTGAAGCAGAGCCATG-  
 GAAAGAGCCTTGAAGTGGATTGGACTTATTACTCCTTACAATGGTGCCTTCTAGCTA-  
 CAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTAAGTGTAGACAAGTCAATCCAGCA-  
 CAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAAGACTCTGCAGCTAATTTCT-  
 GTGCAAGGGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTGACTACTGGGGCCAAAGGAC-  
 CACGGTACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTCCAGGCGGCGGTGGCTCTAGCG-  
 GTGGCGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTC-  
 CAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATG-  
 CACTGGTACCAGCAGAAGTCAAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATC-  
 CAAACTGGCTTCTGGAGTCCCAGGTGCTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAAAACCT-  
 TACTCTCTACAATCAGCAGCGTGGAGGCTGAAGATGATGCAACTTATTACTGCCAG-  
 CAGTGGAGTAAGCACCCCTCTCACGTACGGTGGTGGGACAAAAGTTGGAAATCAA  
 ACCACGACGCCAGCCCGCGGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCC-  
 CAGCCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGGCCGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCA-  
 CACGAGGGGGCTGGACTTCGCCGTGTGATTTCTGGTTACCCATAGGATGTGCAGCCTT-  
 GTTGTAGTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTTACAAAAAAGAAG-  
 TATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTTCATGAGAGCAGT-  
 GAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTAAGAGTGAAGTTTCA-  
 CAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC-  
 GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC-  
 CGGGACCCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCT-  
 GTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAAGATTGGGAT-  
 GAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAG-  
 TACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

Promotor E1-alfa

Líder de CD8

SS1

DIC de BTM de Bisagra  
ICOS

CD3z

Figura 2A

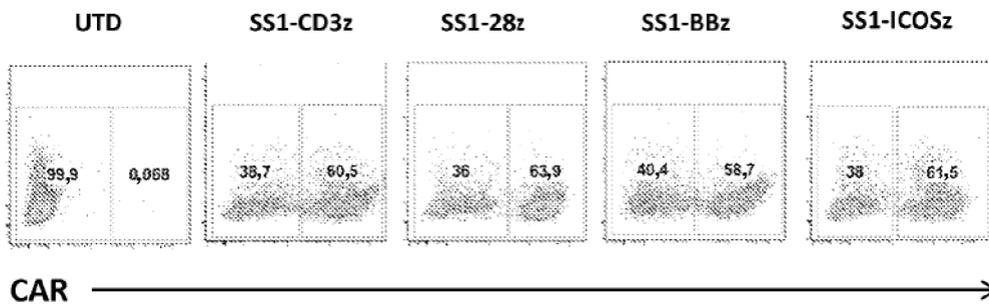
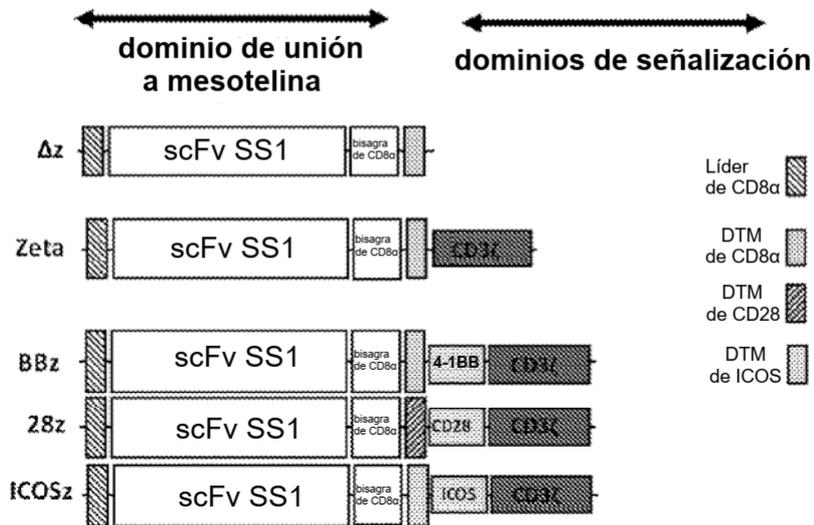


Figura 2B

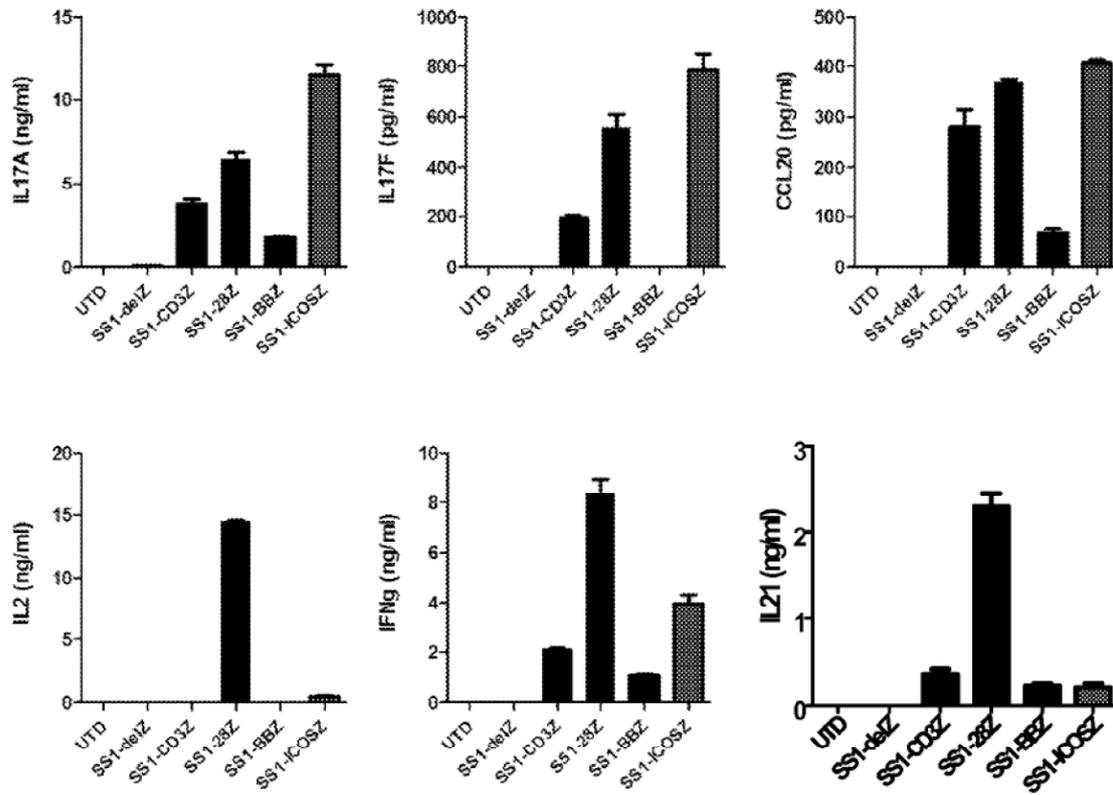


Figura 3

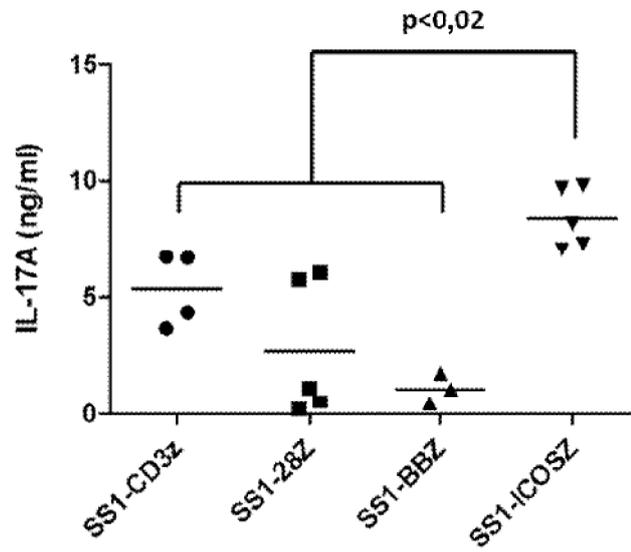


Figura 4

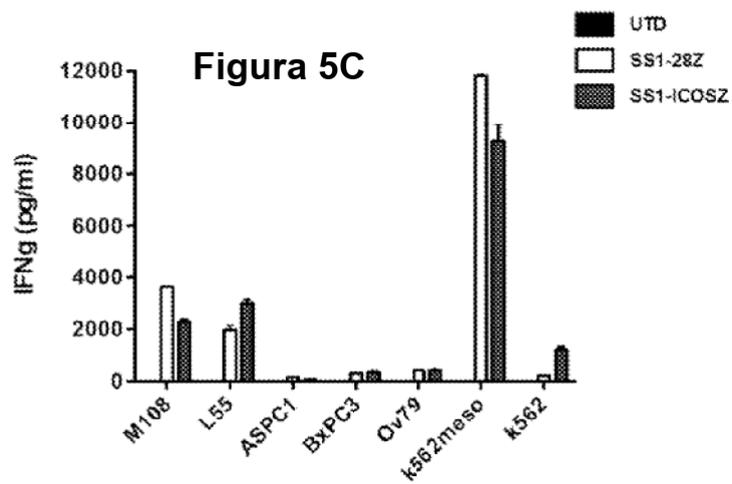
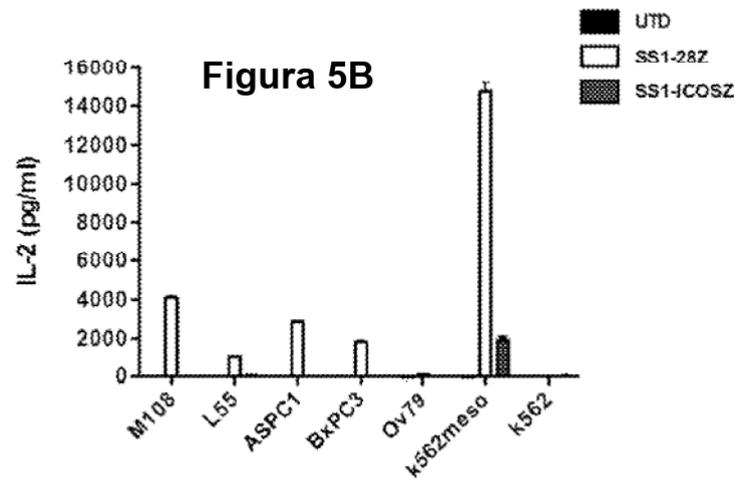
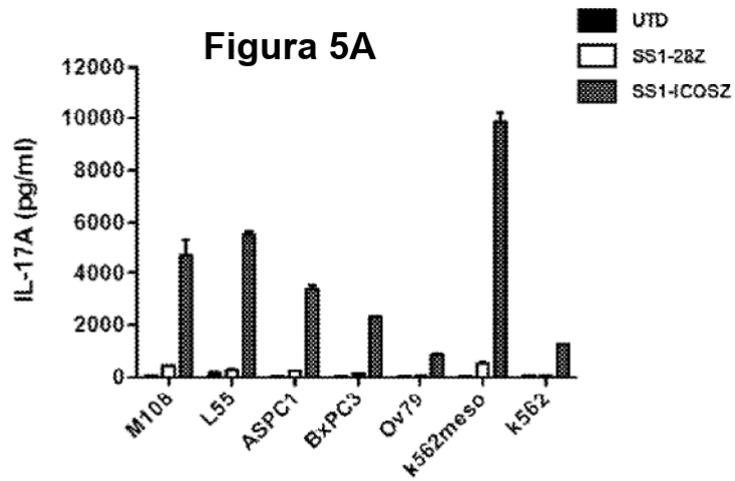
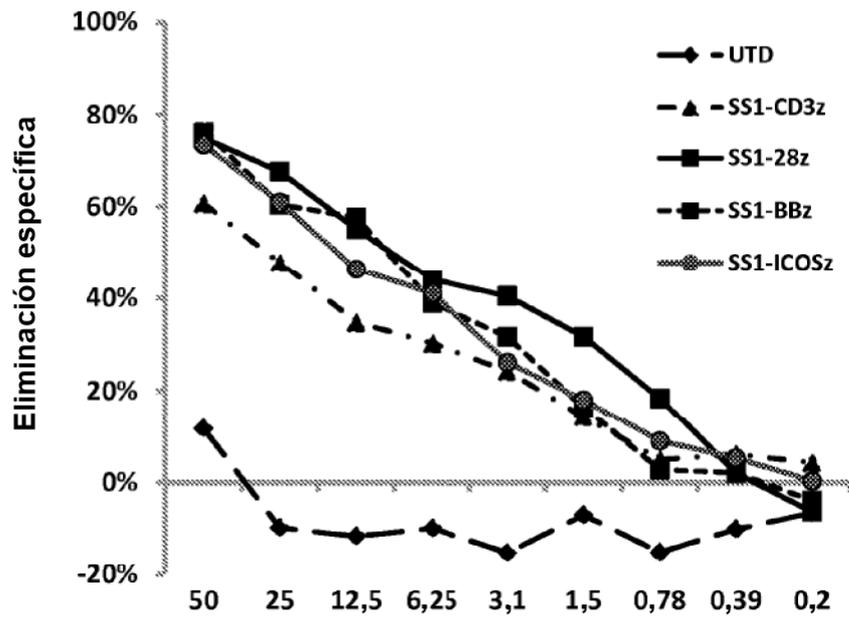


Figura 6A



CAR	CI50
SS1-z	9,92
SS1-28z	2,176
SS1-BBz	9,576
SS1-ICOSz	6,857

Figura 6B

Figura 7A

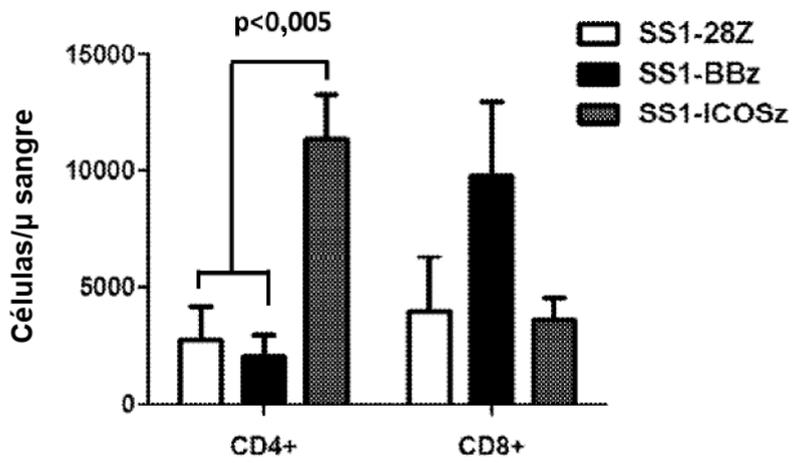
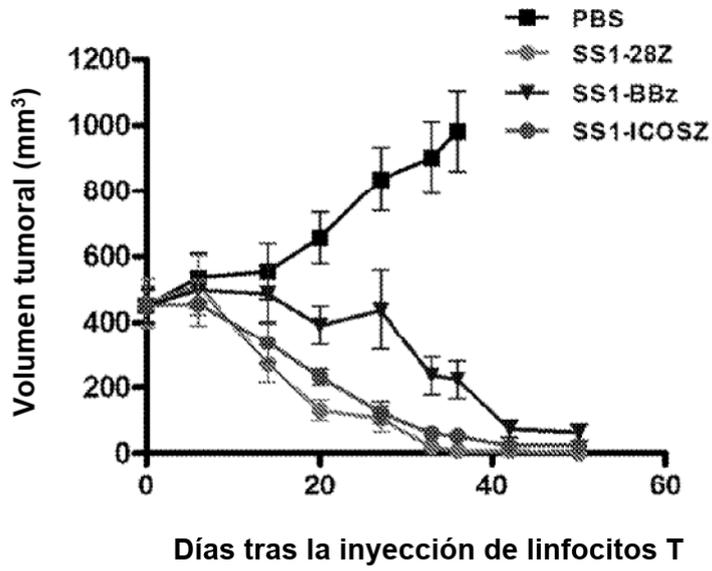


Figura 7B

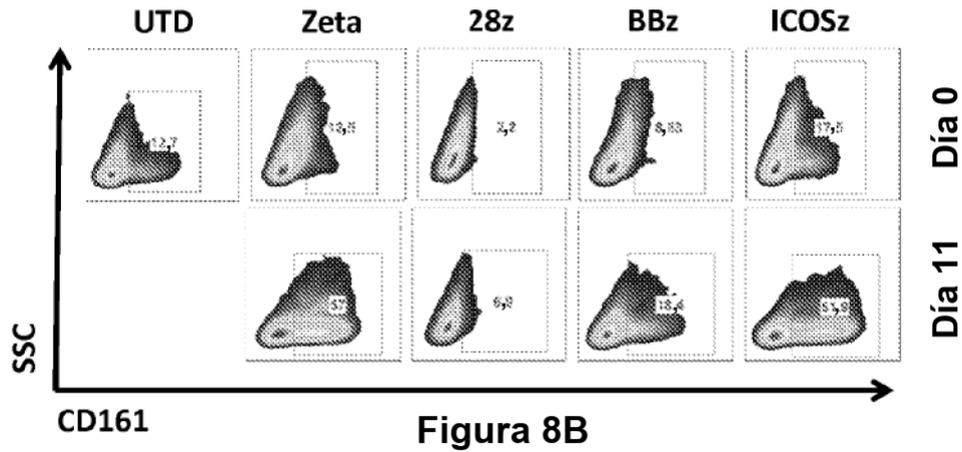
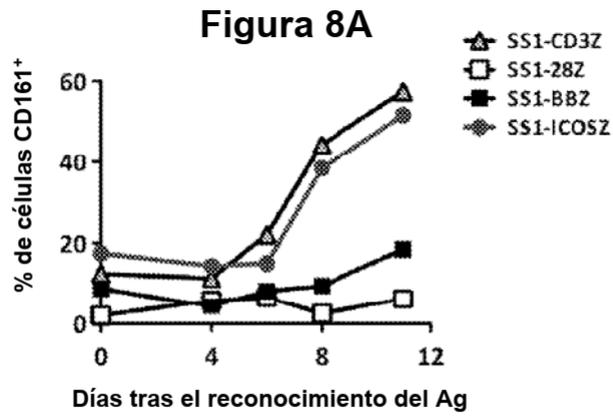


Figura 8C

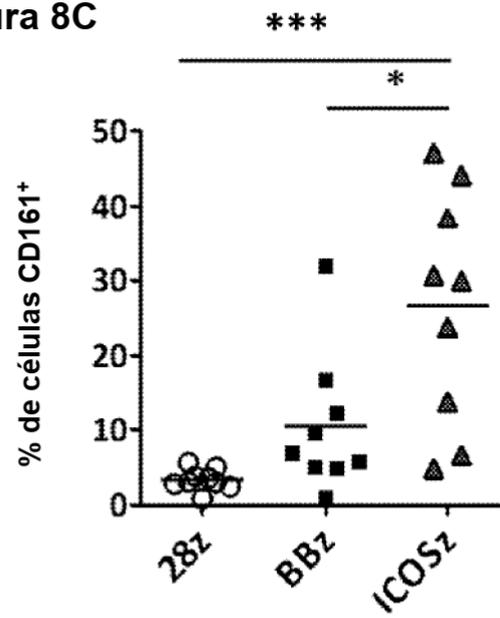


Figura 8D

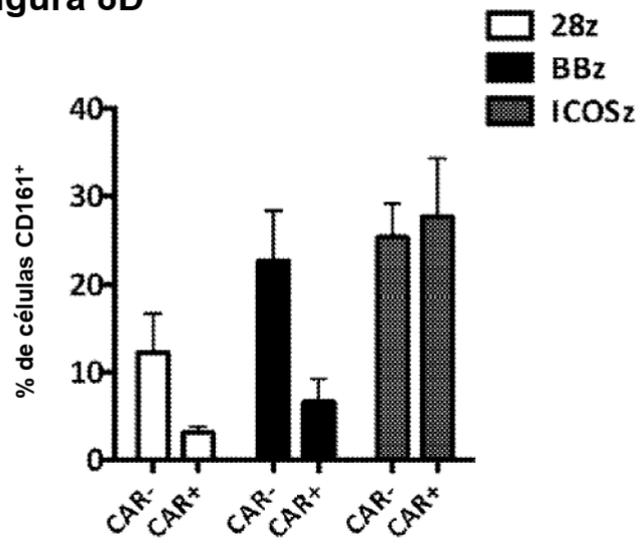


Figura 9A

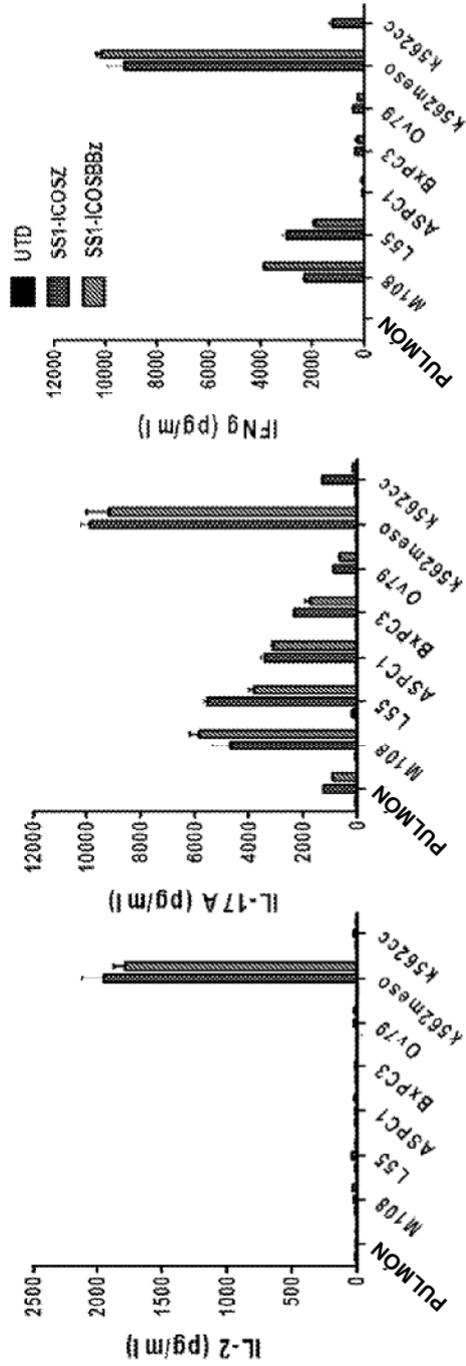
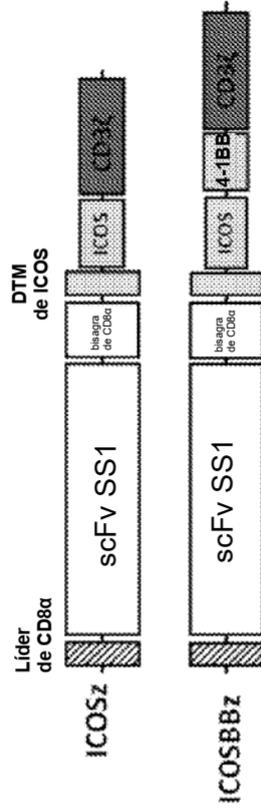


Figura 9B

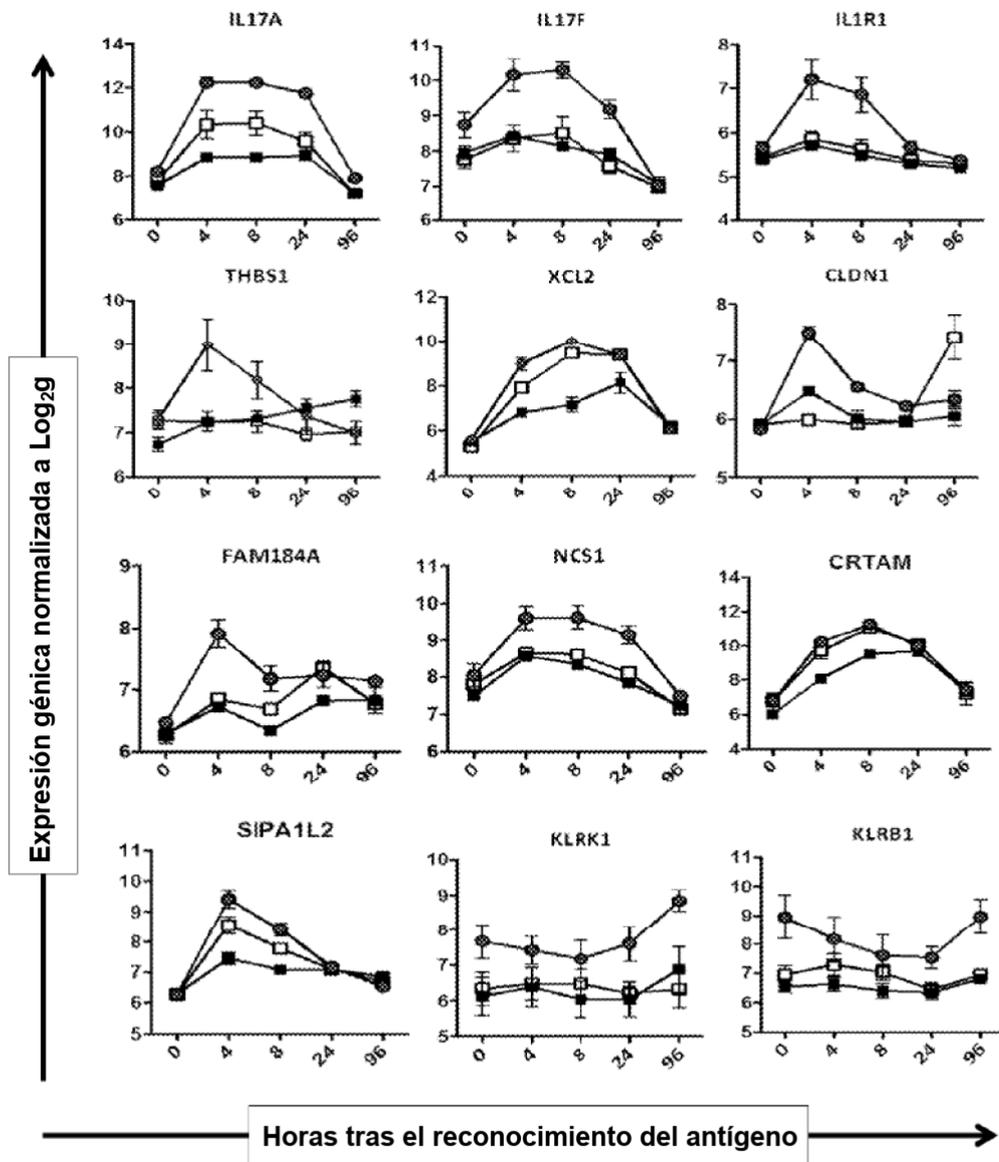


Figura 10A

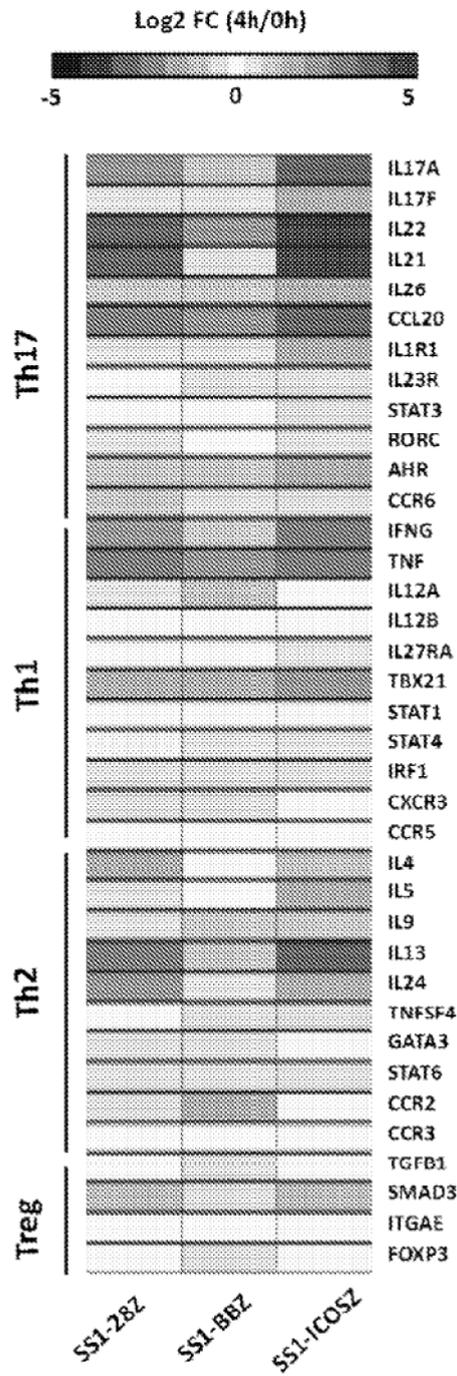


Figura 10B

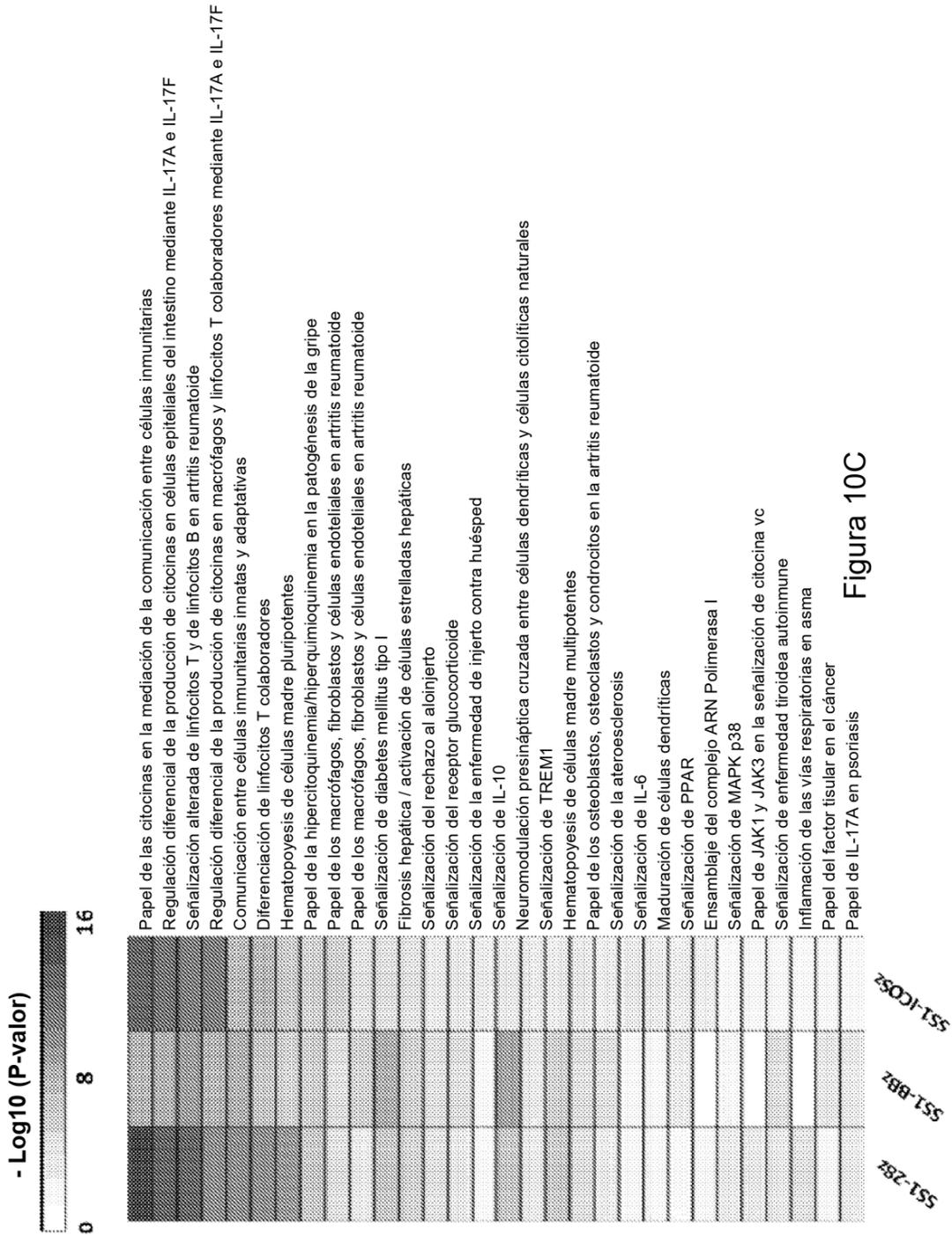


Figura 10C