

RECETTORI ANTIGENICI CHIMERICI CON PROMOTORE MND

RIMANDO A RICHIESTE ATTINENTI

Questa domanda rivendica il beneficio, ai sensi di 35 U.S.C. art. 119(e), della Domanda Provvisoria degli Stati Uniti n° 61/984,561, depositata il 25 aprile 2014, che si incorpora per riferimento nella presente nella sua interezza.

DICHIARAZIONE RIGUARDO AL LISTATO DELLE SEQUENZE

Il Listato delle Sequenze associato a questa domanda si fornisce in formato di testo anziché in copia cartacea e si intende incorporato per riferimento nella specifica. Il nome del file di testo contenente il Listato delle Sequenze è BLBD_027_01WO_ST25.txt. Il file di testo ha una dimensione di 27 kB, è stato creato il 24 aprile 2015 e viene depositato per via elettronica tramite EFS-Web in concomitanza con la deposizione della specifica.

ANTECEDENTI

Settore tecnico

La presente invenzione riguarda composizioni e metodi perfezionati per il trattamento di un cancro o tumore. Più in particolare l'invenzione riguarda vettori perfezionati comprendenti recettori antigenici chimerici (CAR), cellule effettrici immunitarie geneticamente modificate con i vettori per esprimere tali CAR, e

l'uso di tali composizioni per trattare efficacemente varie forme di cancro o tumore.

Descrizione dell'arte attinente

Il cancro è un problema sanitario significativo in tutto il mondo. Stando ai tassi dal periodo 2008-2010 il 40,76% degli uomini e delle donne nati oggi riceveranno una diagnosi di una qualche forma di cancro in un qualche momento nel corso della loro vita. Il 20,37% degli uomini svilupperà un cancro tra il loro 50° e 70° compleanno, a fronte del 15,30% per le donne. Il 1° gennaio 2010 negli Stati Uniti si trovavano all'incirca 13.027.914 uomini e donne in vita con una storia di cancro, 6.078.974 uomini e 6.948.940 donne. Si stima che 1.660.290 uomini e donne (854.790 uomini e 805.500 donne) negli Stati Uniti riceveranno una diagnosi, e che 580.350 uomini e donne moriranno di cancro tra tutte le sedi nel 2013 (Howlader et al., 2013).

In Satiro Nakamura de Oliveira et al., "Modification of Hematopoietic Stem / Progenitor Cells with CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor as a Novel Approach for Cancer Immunotherapy", *Human Gene Therapy*, vol. 24, n° 10, 1° ottobre 2013 (01-10-2013), pagg. 824-839, si rendono noti recettori antigenici chimerici contro il CD19 con uso del promotore MND dei

vettori lentivirali, un dominio transmembrana di CD28 e domini di segnalazione di CD28 e CD3 ζ . Il costrutto comprende una regione cerniera, come mostrato in figura 1 a pagina 825. Si modificavano cellule staminali ematopoietiche / progenitrici (HSPC) umane per esprimere CAR anti-CD19 e si valutavano *in vivo* in seguito a colture di differenziazione in cellule mieloidi o NK, indi si conducevano saggi funzionali per valutare la lisi specifica di bersagli positivi a CD19. In figura 1 si mostrano le ripetizioni terminali lunghe SIN con delezione di intensificazione, raffigurate come riquadri grigi a ciascuna estremità degli elementi della spina dorsale di HIV-1, compreso un segnale di packaging ψ .

Sebbene siano stati compiuti progressi nella rilevazione, prevenzione e trattamento del cancro, non è stata ancora messa a punto una strategia terapeutica che abbia universalmente successo. La risposta delle varie forme di trattamento per il cancro è mista. I metodi tradizionali per il trattamento del cancro, tra cui la chemioterapia e la radioterapia, hanno utilità limitata in ragione degli effetti collaterali tossici. L'immunoterapia con anticorpi terapeutici ha fornito anch'essa un successo limitato, in parte a causa di cattivi profili farmacocinetici, di una

rapida eliminazione di anticorpi tramite proteasi del siero e filtrazione al glomerulo, di una penetrazione limitata al sito di tumore e di livelli di espressione limitati dell'antigene bersaglio sulle cellule tumorali. I tentativi di usare cellule geneticamente modificate esprimenti recettori antigenici chimerici (CAR) hanno trovato anch'essi un successo limitato a causa della scarsa espansione *in vivo* dei linfociti T con CAR, della rapida scomparsa delle cellule dopo l'infusione e della deludente attività clinica.

Nell'arte rimane pertanto il bisogno di composizioni e metodi clinicamente più efficaci per il trattamento del cancro.

BREVE SOMMARIO

L'invenzione fornisce in generale composizioni con vettori perfezionati per generare linfociti T terapeutici.

In varie realizzazioni si fornisce un polinucleotide comprendente un promotore potenziatore del virus del sarcoma mieloproliferativo con delezione della regione di controllo negativo e sostituzione del sito di legame all'innesco dl587rev (MND) operativamente collegato a un recettore antigenico chimerico (CAR).

In particolari realizzazioni un CAR comprende: un dominio extracellulare che si lega a un antigene

selezionato dal gruppo consistente di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Muc1, Muc16, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM e VEGFR2; un dominio transmembrana derivato da un polipeptide selezionato dal gruppo consistente di CD8 α , CD4, CD28, CD45, PD1 e CD152; uno o più domini di segnalazione co-stimolatori intracellulari selezionati dal gruppo consistente di CD28, CD54 (ICAM), CD134 (OX40), CD137 (41BB), CD152 (CTLA4), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1) e CD278 (ICOS); e un dominio di segnalazione primario CD3 ζ .

In alcune realizzazioni il dominio extracellulare comprende un anticorpo o frammento di legame all'antigene che si lega all'antigene.

In particolari realizzazioni l'anticorpo o frammento di legame all'antigene che si lega al polipeptide di

catena leggera kappa è selezionato dal gruppo consistente di: una Ig di camelide, NAR di Ig, frammenti Fab, frammenti Fab', frammenti F(ab)'₂, frammenti F(ab)'₃, Fv, anticorpi Fv a singola catena ("scFv"), bis-scFv, (scFv)₂, minicorpi, diacorpi, triacorpi, tetracorpi, proteine Fv stabilizzate con disolfuro ("dsFv") e anticorpi a singolo dominio (sdAb, nanocorpi).

In realizzazioni aggiuntive l'anticorpo o frammento di legame all'antigene che si lega al polipeptide di catena leggera kappa è un scFv.

In certe realizzazioni l'anticorpo è un anticorpo umano, un anticorpo murino o un anticorpo umanizzato. In particolari realizzazioni il dominio transmembrana è derivato da CD8 α .

In particolari realizzazioni gli uno o più domini di segnalazione co-stimolatori sono selezionati dal gruppo consistente di CD28, CD134 e CD137.

In alcune realizzazioni il CAR comprende due o più domini di segnalazione co-stimolatori selezionati dal gruppo consistente di CD28, CD134 e CD137.

In alcune realizzazioni gli uno o più domini di segnalazione co-stimolatori sono CD28.

In particolari realizzazioni gli uno o più domini di segnalazione co-stimolatori sono CD134.

In certe realizzazioni gli uno o più domini di segnalazione co-stimolatori sono CD137.

In particolari realizzazioni il CAR comprende ulteriormente un polipeptide di regione cerniera.

In ulteriori realizzazioni il polipeptide di regione cerniera comprende una regione cerniera di PD1, CD152 o CD8 α .

In ulteriori realizzazioni il polipeptide di regione cerniera comprende una regione cerniera di PD1.

In ulteriori realizzazioni il polipeptide di regione cerniera comprende una regione cerniera di CD152.

In ulteriori realizzazioni il polipeptide di regione cerniera comprende una regione cerniera di CD8 α .

In alcune realizzazioni il CAR comprende ulteriormente una regione distanziatrice.

In realizzazioni aggiuntive il polipeptide della regione distanziatrice comprende regioni CH2 e CH3 di IgG1.

In certe realizzazioni il CAR comprende ulteriormente un peptide segnale.

In particolari realizzazioni il peptide segnale comprende un polipeptide segnale di catena pesante di IgG1, un polipeptide segnale di CD8 α o un peptide segnale di recettore alfa del GM-CSF umano.

In alcune realizzazioni il polinucleotide codifica un

CAR come presentato in una qualsiasi delle SEQ ID N° 2 e 3.

In varie realizzazioni si fornisce un vettore comprendente il polinucleotide codificante un CAR come contemplato in una qualsiasi delle realizzazioni precedenti o in realizzazioni contemplate altrove in questa sede.

In ulteriori realizzazioni il vettore è un vettore di espressione.

In realizzazioni aggiuntive il vettore è un vettore virale.

In particolari realizzazioni il vettore è un vettore retrovirale.

In particolari realizzazioni il vettore è un vettore lentivirale.

In realizzazioni aggiuntive il vettore lentivirale è selezionato dal gruppo consistente essenzialmente di virus dell'immunodeficienza umana (HIV); virus visna-maedi (VMV); virus dell'artrite-encefalite caprina (CAEV); virus dell'anemia infettiva equina (EIAV); virus dell'immunodeficienza felina (FIV); virus dell'immunodeficienza bovina (BIV); e virus dell'immunodeficienza delle scimmie (SIV).

In certe realizzazioni il CAR comprende ulteriormente una LTR retrovirale sinistra (5'), un segnale di

packaging psi (ψ), un tratto di polipurina centrale / lembo di DNA (cPPT/FLAP), un elemento di esportazione retrovirale; un promotore MND operativamente collegato al CAR di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 19; e una LTR retrovirale destra (3').

In realizzazioni aggiuntive il CAR comprende ulteriormente una sequenza di poliadenilazione eterologa.

In realizzazioni aggiuntive la sequenza di poliadenilazione è una sequenza di poliadenilazione di ormone della crescita dei bovini o una sequenza di poliadenilazione di segnale di β -globina di coniglio.

In particolari realizzazioni il CAR comprende inoltre un elemento regolatore post-trascrizionale di virus dell'epatite B (HPRE) o un elemento regolatore post-trascrizionale di marmotta americana (WPRE).

In alcune realizzazioni il promotore della LTR 5' è sostituito con un promotore eterologo.

In certe realizzazioni il promotore eterologo è un promotore del citomegalovirus (CMV), un promotore del virus del sarcoma di Rous (RSV) o un promotore del virus 40 delle scimmie (SV40).

In ulteriori realizzazioni la LTR 5' o la LTR 3' è una LTR di lentivirus.

In realizzazioni aggiuntive la LTR 3' comprende una o più modifiche.

In particolari realizzazioni la LTR 3' comprende una o più delezioni.

In certe realizzazioni la LTR 3' è una LTR autoattivante (SIN).

In particolari realizzazioni il polinucleotide che codifica il CAR comprende una sequenza di Kozak ottimizzata.

In varie realizzazioni si fornisce una cellula effettrice immunitaria comprendente il vettore come descritto in una qualsiasi delle realizzazioni precedenti o in realizzazioni descritte altrove in questa sede.

In alcune realizzazioni la cellula effettrice immunitaria è un linfocita T.

In varie realizzazioni si fornisce una composizione comprendente la cellula effettrice immunitaria come contemplata in una qualsiasi delle realizzazioni precedenti o in realizzazioni contemplate altrove in questa sede, e un eccipiente fisiologicamente accettabile.

In varie realizzazioni si fornisce un metodo per generare una cellula effettrice immunitaria comprendente l'introduzione in una cellula effettrice immunitaria del vettore come qui contemplato, la stimolazione delle cellule e l'induzione delle cellule a proliferare

tramite contatto delle cellule con anticorpi che si legano a CD3 e anticorpi che si legano a CD28, generando di conseguenza la cellula effettrice immunitaria.

In ulteriori realizzazioni le cellule effettrici immunitarie vengono stimulate e indotte a proliferare prima di introdurre il vettore.

In particolari realizzazioni le cellule effettrici immunitarie comprendono linfociti T.

In varie realizzazioni si fornisce un metodo per creare una cellula effettrice immunitaria comprendente un polinucleotide qui contemplato, comprendente l'isolamento di cellule CD34+ da midollo osseo, sangue di cordone o sangue periferico mobilizzato da un soggetto, e l'introduzione di un vettore qui contemplato nelle cellule CD34+ isolate.

In realizzazioni aggiuntive le cellule CD34+ vengono pre-stimate con una o più citochine selezionate dal gruppo consistente di ligando FLT3, TPO, SCF, IL-3 e IL-6 prima di introdurre il vettore secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 20 a 36.

In varie realizzazioni si fornisce un metodo di trattamento di un cancro in un soggetto bisognoso in tal senso comprendente la somministrazione al soggetto di una quantità terapeuticamente efficace di una

composizione contemplata in questa sede.

In certe realizzazioni il cancro è selezionato dal gruppo consistente di tumore di Wilms, sarcoma di Ewing, un tumore neuroendocrino, un glioblastoma, un neuroblastoma, un melanoma, cancro della pelle, cancro della mammella, cancro del colon, cancro rettale, cancro della prostata, cancro del fegato, cancro renale, cancro pancreatico, cancro del polmone, cancro biliare, cancro cervicale, cancro endometriale, cancro esofageo, cancro gastrico, cancro della testa e del collo, carcinoma midollare della tiroide, cancro ovarico, glioma, linfoma, leucemia, mieloma, leucemia linfoblastica acuta, leucemia mielogena acuta, leucemia mielogena cronica, leucemia mielogena cronica, linfoma di Hodgkin, linfoma non Hodgkin e cancro della vescica urinaria.

In particolari realizzazioni il cancro è cancro pancreatico e il dominio di legame extracellulare si lega a un epitopo di PSCA o MUC1.

In ulteriori realizzazioni il cancro è cancro della vescica e il dominio di legame extracellulare si lega a un epitopo di PSCA o MUC1.

In particolari realizzazioni il cancro è glioblastoma multiforme e il dominio di legame extracellulare si lega a un epitopo di EPHA2, EGFRvIII o CSPG4.

In particolari realizzazioni il cancro è cancro del polmone e il dominio di legame extracellulare si lega a un epitopo di PSCA o GD2.

In certe realizzazioni il cancro è cancro della mammella e il dominio di legame extracellulare si lega a un epitopo di CSPG4 o HER2.

In alcune realizzazioni il cancro è melanoma e il dominio di legame extracellulare si lega a un epitopo di CSPG4 o GD2.

In varie realizzazioni si fornisce un metodo di trattamento di una malignità ematologica in un soggetto bisognoso in tal senso comprendente la somministrazione al soggetto di una quantità terapeuticamente efficace di una composizione contemplata in questa sede. In ulteriori realizzazioni la malignità ematologica è una malignità dei linfociti B selezionata dal gruppo consistente di: mieloma multiplo (MM), leucemia mielogena cronica (CLL) e linfoma non Hodgkin (NHL).

In particolari realizzazioni il MM è selezionato dal gruppo consistente di mieloma multiplo manifesto, mieloma multiplo latente, leucemia alle cellule del plasma, mieloma non secretorio, mieloma a IgD, mieloma osteosclerotico, plasmocitoma solitario delle ossa e plasmocitoma extramidollare.

In certe realizzazioni il NHL è selezionato dal gruppo

consistente di linfoma di Burkitt, leucemia linfocitica cronica / piccolo linfoma linfocitico (CLL/SLL), grande linfoma diffuso a linfociti B, linfoma follicolare, linfoma immunoblastico a grandi cellule, linfoma linfoblastico ai precursori B e linfoma delle cellule del mantello.

BREVE DESCRIZIONE DELLE VARIE VISTE DEI DISEGNI

In **figura 1** si mostra la struttura di un costrutto con CAR pMND-CD19 (A) e di un costrutto con CAR pMND-kappa_{LC} (B).

In **figura 2** si mostra la mappa vettoriale per un CAR pMND-CD19.

In **figura 3** si mostra la mappa vettoriale per un CAR pMND-kappa_{LC}.

In **figura 4** si mostra il numero di copie dei vettori (VCN) per particelle lentivirali di CAR pMND-kappa_{LC} integrato. Il VCN si determinava via q-PCR nove giorni dopo la trasduzione. Ogni circoletto rappresenta una coltura unica svolta in parallelo con colture di linfociti T non modificate in abbinamento (quadrati). I dati riportati provengono da 12 colture uniche composte da 6 donatori. La media e la deviazione standard sono rappresentate dalla linea e dalle barre di errore.

In **figura 5** si mostra l'espressione di kappa_{LC} in linfociti T trasdotti con CAR di pMND-kappa_{LC}.

L'espressione di CAR sui linfociti T si determinava via citometria a flusso da sei a nove giorni dopo la trasduzione. Ogni circoletto rappresenta una coltura unica svolta in parallelo con colture di linfociti T non modificate in abbinamento (quadrati). I dati riportati provengono da 12 colture uniche composte da 6 donatori. La media e la deviazione standard sono rappresentate dalla linea e dalle barre di errore.

In **figura 6** si mostra una trasduzione comparabile di CAR di CD19 ed espressione in linfociti T trasdotti con vettori lentivirali con CAR pMND- o pEF1 α -CD19. Questi vettori si usavano per trasdurre colture parallele abbinate di linfociti T umani primari. L'espressione di CAR sui linfociti T si determinava via citometria a flusso sei giorni dopo la trasduzione. Il numero di copie vettoriali (VCN) delle particelle lentivirali integrate si determinava via q-PCR nove giorni dopo la trasduzione.

In **figura 7** si mostra la reattività tumorale specifica di linfociti T modificati con CAR di pMND-kappa_{LC}. I linfociti T modificati si co-coltivavano con cellule Daudi kappa+ o HDLM-2 kappa- per 24 ore. Il rilascio di IFN- γ specifico per tumore si saggiava tramite ELISA. I dati riportati provengono da 5 colture uniche di linfociti T da 4 donatori.

In **figura 8** si mostra la regressione di tumori di Daudi consolidati in seguito a trasferimento adottivo di linfociti T modificati con CAR pMND-kappa_{LC}. I linfociti T modificati si usavano per trattare topi con tumori di Daudi consolidati. Il carico tumorale dopo il trattamento si monitorava tramite imagingografia *in vivo* in confronto con animali di controllo non trattati. I dati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti.

In **figura 9** si mostra la rimozione tumorale specifica per antigene con uso di linfociti T esprimenti CAR. (A): i linfociti T con CAR esprimenti anti-BCMA uccidevano cellule tumorali esprimenti BCMA etichettate con carbossifluoresceina succinimidilestere (CFSE); la fluorescenza si misurava tramite FACS. (B): si co-coltivavano linfociti T con CAR esprimenti anti-BCMA con cellule K562 e con cellule K562 geneticamente modificate per esprimere BCMA, indi si raccoglievano i surnatanti 24 ore dopo e si saggiavano per il rilascio di IFN- γ tramite ELISA (n = 3).

BREVE DESCRIZIONE DEGLI IDENTIFICATORI DI SEQUENZA

La **SEQ ID N° 1** presenta la sequenza polinucleotidica del promotore potenziatore del virus del sarcoma mieloproliferativo con delezione della regione di controllo negativo e sostituzione del sito di legame

all'innesco dl587rev (MND).

La **SEQ ID N° 2** presenta la sequenza polinucleotidica di un costrutto CAR anti-CD19 di promotore MND.

La **SEQ ID N° 3** presenta la sequenza polinucleotidica di un costrutto CAR di catena leggera anti-kappa di promotore MND.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

A. Panoramica

L'invenzione riguarda in generale composizioni e metodi perfezionati per il trattamento del cancro, tra cui a titolo non limitativo forme di tumore o cancro del fegato, pancreas, polmone, mammella, vescica, cervello, ossa, tiroide, rene, pelle, e sistema ematopoietico. In particolare l'invenzione riguarda la terapia cellulare adottiva di cellule effettrici immunitarie geneticamente modificate con vettori comprendenti un promotore potenziatore del virus del sarcoma mieloproliferativo con delezione della regione di controllo negativo e sostituzione del sito di legame all'innesco dl587rev (MND) operativamente collegato a un polinucleotide codificante un recettore antigenico chimerico.

Gli aspetti genetici offrono un potenziale mezzo per intensificare il riconoscimento immunitario e l'eliminazione di cellule cancerose. Una strategia

promettente consiste nel sottoporre a ingegneria genetica cellule effettrici immunitarie a scopo di espressione di recettori antigenici chimerici che ridirigano la citotossicità verso le cellule tumorali. Le immunoterapie cellulari adottive esistenti per il trattamento di forme di tumore o di cancro sono però prive di livelli di espressione persistenti e sufficienti di CAR nelle cellule terapeutiche. Di conseguenza tali terapie non sono clinicamente desiderabili, per cui nell'arte rimane il bisogno di terapie più efficienti per malignità a linfociti B che risparmino l'immunità tumorale.

Le composizioni e metodi perfezionati di terapia cellulare adottiva qui esposti forniscono cellule effettrici immunitarie geneticamente modificate che possono essere rapidamente espanse, esibiscono persistenza a lungo termine *in vivo* e forniscono un'espressione persistente e sufficiente di polipeptidi CAR. Senza volersi limitare ad alcuna particolare teoria, la presente invenzione contempla in parte la sorprendente scoperta del fatto che il promotore MND dirige un'espressione persistente di polipeptidi CAR in linfociti T a riposo, attivati ed espansi, e che tale espressione è sufficiente a ridirigere efficacemente le cellule effettrici immunitarie geneticamente

modificate contemplate in questa sede per suscitare un'attività citotossica contro la cellula tumorale o cancerosa.

In una realizzazione un polinucleotide comprende un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide codificante un CAR, il CAR comprendendo un dominio extracellulare che si lega a un antigene bersaglio, un dominio transmembrana, e uno o più domini intracellulari di segnalazione.

In una realizzazione un linfocita T è geneticamente modificato con un vettore comprendente un promotore MND operativamente collegato a un CAR qui contemplato. In questa sede i linfociti T esprimenti CAR sono detti linfociti T con CAR o linfociti T modificati con CAR. In varie realizzazioni i linfociti T con CAR geneticamente modificati qui contemplati sono somministrati a un paziente avente un cancro o un tumore.

La pratica dell'invenzione utilizzerà, salvo specifica indicazione in senso contrario, metodi convenzionali di chimica, biochimica, chimica organica, biologia molecolare, microbiologia, tecniche a DNA ricombinante, genetica, immunologia e biologia cellulare che rientrano nelle competenze dell'arte, molti dei quali si descrivono nel seguito a scopo illustrativo. Tali tecniche sono spiegate per intero in letteratura. Si

vedano ad esempio Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3^a edizione, 2001); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^a edizione, 1989); Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, aggiornamento luglio 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I e II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes* (Academic Press, New York, 1992); *Transcription and Translation* (a cura di B. Hames e S. Higgins, 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Harlow and Lane, *Antibodies* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology*, a cura di Q.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach e W. Strober, 1991); e *Annual Review of Immunology*; oltre a monografie in riviste come *Advances in Immunology*.

B. Definizioni

Salvo ove diversamente definito, tutti i termini tecnici e scientifici usati in questa sede hanno lo stesso

significato comunemente inteso dai comuni esperti del settore di appartenenza dell'invenzione. Sebbene qualsiasi metodo e materiale simile o equivalente a quelli qui descritti possa essere usato nella pratica o nell'esecuzione di prove sulla presente invenzione, in questa sede si descrivono realizzazioni preferite di composizioni, metodi e materiali. Ai fini della presente invenzione si definiranno ora i termini seguenti.

Gli articoli "un", "uno", "una", "il", "lo", "la", si usano in questa sede in riferimento a uno o più di uno (ovvero almeno uno) degli oggetti grammaticali dell'articolo. A titolo di esempio, "un elemento" significa un elemento o più di un elemento.

Ai presenti fini il termine "circa" o "approssimativamente" indica una quantità, livello, valore, numero, frequenza, percentuale, dimensione, misura, entità, peso o lunghezza che possa variare anche fino al 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1% rispetto a una quantità, livello, valore, numero, frequenza, percentuale, dimensione, misura, entità, peso o lunghezza di riferimento. In particolari realizzazioni i termini "circa" o "approssimativamente" se precedenti un valore numerico indicano il valore più o meno un intervallo del 15%, 10%, 5% o 1%.

In tutta la presente specifica, salvo ove il contesto richieda altrimenti, i termini "comprendere", "comprende" e "comprendente" si intenderanno implicare l'inclusione di una fase o elemento o gruppo di fasi o elementi specificati ma senza esclusione di alcun'altra fase o elemento o gruppo di fasi o di elementi. Per "consistente di" si intende comprendente e limitato a qualsiasi cosa segua l'espressione "consistente di". L'espressione "consistente di" indica quindi che gli elementi elencati sono richiesti od obbligatori e che nessun altro elemento potrà essere presente. Per "consistente essenzialmente di" si intende comprendente ogni elemento elencato dopo l'espressione limitatamente ad altri elementi che non interferiscano né contribuiscano all'attività o azione specificata nell'esposizione per gli elementi riportati; la frase "consistente essenzialmente di" indica quindi che gli elementi riportati sono richiesti od obbligatori ma che altri elementi sono facoltativi e potrebbero essere presenti oppure no in funzione del fatto che essi influiscano sull'attività o azione degli elementi riportati.

Il riferimento in tutta la presente specifica a "una realizzazione", "realizzazione", "una particolare realizzazione", "una realizzazione collegata", "una

certa realizzazione", "una realizzazione aggiuntiva" o "un'ulteriore realizzazione", o combinazioni di questi, significa che un particolare attributo, struttura o caratteristica descritta in unione con la realizzazione è inclusa in almeno una realizzazione della presente invenzione. Pertanto, la presenza delle espressioni di cui sopra in vari punti in tutta la presente specifica non si riferisce necessariamente sempre alla stessa realizzazione. In aggiunta i particolari attributi, strutture o caratteristiche potranno essere combinati in qualsiasi maniera idonea in una o più realizzazioni.

C. Recettori antigenici chimerici

In varie realizzazioni la presente invenzione fornisce cellule effettrici immunitarie sottoposte a ingegneria genetica con vettori progettati per l'espressione di recettori antigenici chimerici che ridirigano la citotossicità verso cellule tumorali. In questa sede tali recettori sottoposti a ingegneria genetica sono detti recettori antigenici chimerici (CAR). I CAR sono molecole che combinano una specificità basata su anticorpo per un antigene bersaglio (ad esempio un antigene tumorale) con un dominio intracellulare attivante i recettori dei linfociti T per generare una proteina chimerica che esibisca una specifica attività

immunitaria anti-cellule tumorali. Ai presenti fini il termine "chimerico" denota entità composte da parti di differenti proteine o DNA da differenti origini.

I vettori qui contemplati comprendono un promotore MND e un polinucleotide codificante un CAR. I CAR qui contemplati comprendono un dominio extracellulare che si lega a uno specifico antigene bersaglio (detto anche dominio di legame o dominio di legame specifico per l'antigene), un dominio transmembrana e un dominio intracellulare di segnalazione. L'impegno del dominio di legame dell'antigene del CAR con il proprio antigene bersaglio sulla superficie di una cellula bersaglio dà luogo all'agglomerazione del CAR e invia uno stimolo di attivazione alla cellula contenente il CAR. La caratteristica principale dei CAR è la loro capacità di ridirigere la specificità a cellule effettrici immunitarie innescando di conseguenza proliferazione, produzione di citochine, fagocitosi o produzione di molecole che possano mediare la morte cellulare della cellula esprime l'antigene bersaglio in maniera indipendente dal complesso di istocompatibilità maggiore (MHC) sfruttando le capacità di puntamento specifiche per cellule di anticorpi monoclonali, ligandi solubili o co-recettori specifici per cellule.

In particolari realizzazioni un CAR comprende un

dominio di legame extracellulare, compreso a titolo non limitativo un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene, un ligando allacciato, o il dominio extracellulare di un co-recettore, che si lega specificamente a un antigene bersaglio selezionato dal gruppo consistente di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Mucl, Muc16, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM e VEGFR2; uno o più domini cerniera o domini distanziatori; un dominio transmembrana, compresi a titolo non limitativo domini transmembrana da CD8 α , CD4, CD45, PD1 e CD152; uno o più domini di segnalazione co-stimolatori intracellulari, compresi a titolo non limitativo domini di segnalazione co-stimolatori intracellulari da CD28, CD54 (ICAM), CD134 (OX40), CD137 (41BB), CD152 (CTLA4), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1) e CD278 (ICOS);

e un dominio di segnalazione primario da CD3 ζ o FcR γ .

1. Dominio di legame

In particolari realizzazioni i CAR contemplati in questa sede comprendono un dominio di legame extracellulare che si lega specificamente a un polipeptide bersaglio, ad esempio un antigene bersaglio, espresso su una cellula tumorale. Ai presenti fini i termini "dominio di legame", "dominio extracellulare", "dominio di legame extracellulare", "dominio di legame specifico per antigene" e "dominio di legame extracellulare specifico per antigene" si usano in modo intercambiabile a indicare CAR capaci di legarsi specificamente all'antigene bersaglio di interesse. Un dominio di legame può comprendere qualsiasi proteina, polipeptide, oligopeptide o peptide che possieda la capacità di riconoscere specificamente e legarsi a una molecola biologica (ad esempio un recettore della superficie cellulare o proteina tumorale, lipide, polisaccaride, o altra molecola bersaglio sulla superficie cellulare o relativo componente). Un dominio di legame include qualsiasi partner di legame esistente in natura, sintetico, semisintetico o prodotto per via ricombinante per una molecola biologica di interesse.

Le espressioni "affinità di legame specifico" o "si lega specificamente a" o "legato specificamente a"

o "legame specifico" o "punta specificamente" ai presenti fini descrivono il legame di una molecola a un'altra con affinità di legame maggiore rispetto a un legame di fondo. Un dominio di legame (o un CAR comprendente un dominio di legame o una proteina di fusione contenente un dominio di legame) "si lega specificamente" a una molecola bersaglio se si lega o si associa con una molecola bersaglio con affinità o K_a (cioè la costante di associazione in equilibrio per una particolare interazione di legame con unità in $1/M$) ad esempio maggiore o uguale a circa $10^5 M^{-1}$. In certe realizzazioni un dominio di legame (o una relativa proteina di fusione) si lega a un bersaglio con una K_a maggiore o uguale a circa $10^6 M^{-1}$, $10^7 M^{-1}$, $10^8 M^{-1}$, $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, $10^{12} M^{-1}$, o $10^{13} M^{-1}$. Per domini di legame "ad alta affinità" (o relative proteine di fusione a singola catena) si intendono i domini di legame che esibiscono una K_a pari ad almeno $10^7 M^{-1}$, almeno $10^8 M^{-1}$, almeno $10^9 M^{-1}$, almeno $10^{10} M^{-1}$, almeno $10^{11} M^{-1}$, almeno $10^{12} M^{-1}$, almeno $10^{13} M^{-1}$ o maggiore.

In alternativa l'affinità può essere definita come costante di dissociazione in equilibrio (K_d) per una particolare interazione di legame con unità in M (ad esempio da $10^{-5} M$ a $10^{-13} M$ o inferiore). Le affinità

dei polipeptidi dei domini di legame e delle proteine CAR secondo la presente esposizione possono essere facilmente determinate con l'ausilio di tecniche convenzionali, ad esempio ELISA (saggio immunosorbente legato a un enzima) con competizione, o per associazione di legame, o tramite saggi di spostamento con uso di ligandi etichettati, o con l'ausilio di un dispositivo per risonanza plasmonica di superficie, ad esempio con Biacore T100, disponibile presso Biacore, Inc. di Piscataway, NJ, o mediante tecnologie a biosensori ottici, ad esempio con sistemi EPIC o EnSpire, disponibili rispettivamente presso Corning e Perkin Elmer (si vedano inoltre ad esempio Scatchard et al. (1949), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660; e i Brevetti degli Stati Uniti n° 5,283,173 e 5,468,614, o equivalenti). In una realizzazione l'affinità del legame specifico è circa 2 volte maggiore rispetto al legame di fondo, circa 5 volte maggiore rispetto al legame di fondo, circa 10 volte maggiore rispetto al legame di fondo, circa 20 volte maggiore rispetto al legame di fondo, circa 50 volte maggiore rispetto al legame di fondo, circa 100 volte maggiore rispetto al legame di fondo o circa 1000 volte maggiore rispetto al legame di fondo, o più.

In particolari realizzazioni il dominio di legame

extracellulare di un CAR comprende un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene. Per "anticorpo" si intende un agente di legame che consiste di un polipeptide comprendente almeno una regione variabile di catena leggera o catena pesante di immunoglobulina che riconosce specificamente e si lega a un epitopo di un antigene, come un peptide, lipide, polisaccaride o acido nucleico contenente un determinante antigenico, come quelli riconosciuti da una cellula immunitaria.

Per "antigene (Ag)" si intende un composto, composizione o sostanza che possa stimolare la produzione di anticorpi o una risposta di linfociti T in un animale, comprese composizioni (come quelle che includono una proteina specifica per tumore) che vengono iniettate o assorbite in un animale. Un antigene reagisce con prodotti di immunità umorale o cellulare specifica, compresi quelli indotti da antigeni eterologhi, ad esempio gli antigeni qui esposti. Un "antigene bersaglio" o "antigene bersaglio di interesse" è un antigene al quale un dominio di legame di un CAR qui contemplato è progettato per legarsi. In particolari realizzazioni l'antigene bersaglio è un epitopo di un peptide, lipide, polisaccaride o acido nucleico al quale il dominio di legame si lega specificamente. In una

realizzazione preferita l'antigene è un epitopo di un polipeptide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Mucl, Muc16, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2.

Per "epitopo" o "determinante antigenico" si intende la regione di un antigene al quale si lega un agente di legame. Gli epitopi possono essere costituiti sia da amminoacidi contigui sia da amminoacidi non contigui giustapposti per ripiegamento terziario di una proteina. Gli epitopi costituiti da amminoacidi contigui rimangono tipicamente conservati all'esposizione a solventi denaturanti, mentre invece gli epitopi costituiti per ripiegamento terziario vanno tipicamente perduti al trattamento con solventi denaturanti. Un epitopo include tipicamente almeno 3 e più comunemente almeno 5, circa 9 o circa 8-10 amminoacidi in una

conformazione spaziale univoca.

Gli anticorpi includono relativi frammenti di legame ad antigene, come Ig di camelide, NAR di Ig, frammenti Fab, frammenti Fab', frammenti F(ab)'₂, frammenti F(ab)'₃, Fv, proteine Fv a singola catena ("scFv"), bis-scFv, (scFv)₂, minicorpi, diacorpi, triacorpi, tetracorpi, proteine Fv stabilizzate con disolfuro ("dsFv") e anticorpi a singolo dominio (sdAb, nanocorpi), oltre a porzioni di anticorpi di lunghezza completa responsabili del legame all'antigene. Il termine include inoltre forme ottenute per ingegneria genetica come anticorpi chimerici (ad esempio anticorpi murini umanizzati), anticorpi eteroconiugati (come gli anticorpi bispecifici) e relativi frammenti di legame all'antigene. Si vedano inoltre Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995, da Pierce Chemical Co. di Rockford, IL; e Kubly, J., Immunology, 3^a ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1997.

Come gli esperti del settore comprendono e come descritto altrove in questa sede, un anticorpo completo comprende due catene pesanti e due catene leggere. Ciascuna catena pesante consiste di una regione variabile e di una prima, seconda e terza regione costante, mentre ciascuna catena leggera consiste di una regione variabile e una regione costante. Le catene pesanti di

mammifero sono classificate come α , δ , ε , γ e μ , mentre le catene leggere di mammifero sono classificate come λ o κ .

Le immunoglobuline comprendenti le catene pesanti α , δ , ε , γ e μ sono classificate come immunoglobulina (Ig) IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. L'anticorpo completo forma una sagoma a Y. Lo stelo della Y consiste della seconda e terza regione costante (e per IgE e IgM la quarta regione costante) di due catene pesanti legate insieme, e si formano ponti disolfuro (intercatena) cerniera. Le catene pesanti γ , α e δ hanno una regione costante composta da tre domini Ig in tandem (in linea), e una regione cerniera per aggiungere flessibilità; le catene pesanti μ e ε hanno una regione costante composta da quattro domini di immunoglobulina. La seconda e la terza regione costante sono dette rispettivamente "dominio CH2" e "dominio CH3". Ciascun braccio della Y include la regione variabile e la prima regione costante di una singola catena pesante legata alla regione variabile e a quella costante di una singola catena leggera. Le regioni variabili delle catene leggere e pesanti hanno la responsabilità del legame all'antigene.

Le regioni variabili delle catene pesanti e leggere contengono una regione "cornice" interrotta da tre

regioni ipervariabili, dette anche "regioni determinanti complementarità" o "CDR". Le CDR possono essere definite o identificate tramite metodi convenzionali, ad esempio per sequenza in accordo con Kabat et al. (T.T. Wu e E.A. Kabat, *J. Exp. Med.* 132(2):211-50, (1970); P. Borden e E.A. Kabat, *PNAS* 84:2440-2443 (1987); si veda Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Dipartimento della Sanità e dei Servizi Umani degli Stati Uniti, 1991, che si incorpora nella presente per riferimento), o per struttura in accordo con Chothia et al. (C. Choithia e A.M. Lesk, *J. Mol. Biol.* 196(4):901-917 (1987), C. Choithia et al., *Nature* 342:877-883 (1989)).

Le sequenze delle regioni cornice di catene leggere o pesanti differenti sono relativamente conservate all'interno di una specie, come l'uomo. La regione cornice di un anticorpo, che consiste delle regioni cornice combinate delle catene leggere e pesanti costitutive, serve a posizionare e allineare le CDR nello spazio tridimensionale. Le CDR sono principalmente responsabili per il legame a un epitopo di un antigene. Le CDR di ciascuna catena sono tipicamente dette CDR1, CDR2 e CDR3, numerate in sequenza a partire dal terminale N, e inoltre sono tipicamente identificate dalla catena in cui la particolare CDR è situata.

Di conseguenza le CDR situate nel dominio variabile della catena pesante dell'anticorpo sono dette CDRH1, CDRH2 e CDRH3, mentre le CDR situate nel dominio variabile della catena leggera dell'anticorpo sono dette CDRL1, CDRL2 e CDRL3. Anticorpi con specificità diverse (ossia che combinino siti diversi per antigeni diversi) hanno CDR diverse. Pure se le CDR sono quelle che variano da anticorpo ad anticorpo, solo un numero limitato di posizioni di amminoacidi all'interno delle CDR è coinvolto direttamente nel legame all'antigene. Tali posizioni all'interno delle CDR sono dette residui determinanti specificità (SDR).

I riferimenti "V_H" o "VH" indicano la regione variabile di una catena pesante di immunoglobulina, compresa quella di un anticorpo, Fv, scFv, dsFv, Fab, o altro frammento di anticorpo come qui esposto. I riferimenti "V_L" o "VL" indicano la regione variabile di una catena leggera di immunoglobulina, compresa quella di un frammento di anticorpo, Fv, scFv, dsFv, Fab, o altro frammento di anticorpo come qui esposto.

Un anticorpo "monoclonale" è un anticorpo prodotto da un singolo clone di linfociti B o da una cellula in cui siano stati trasferiti i geni di catene leggere e pesanti di un singolo anticorpo. Si producono anticorpi monoclonali con metodi noti agli esperti del

settore, ad esempio creando cellule ibride formanti anticorpo da una fusione di cellule di mieloma con cellule immunitarie di milza. Gli anticorpi monoclonali includono anticorpi monoclonali umanizzati.

Un anticorpo "chimerico" possiede residui cornice da una specie, come l'uomo, e CDR (che in genere conferiscono il legame all'antigene) da un'altra specie, come il topo. In particolari realizzazioni preferite un CAR qui contemplato comprende un dominio di legame specifico per antigene che è un anticorpo chimerico o un relativo frammento di legame all'antigene.

In certe realizzazioni preferite l'anticorpo è un anticorpo umanizzato (come un anticorpo monoclonale umanizzato) che si lega specificamente a una proteina di superficie su una cellula tumorale. Un anticorpo "umanizzato" è un'immunoglobulina comprendente una regione cornice umana e una o più CDR da un'immunoglobulina non umana (ad esempio di topo, di ratto, o sintetica). L'immunoglobulina non umana che fornisce le CDR è detta "donatore", mentre l'immunoglobulina umana che fornisce la cornice è detta "accettore". In una realizzazione tutte le CDR provengono dall'immunoglobulina donatrice in un'immunoglobulina umanizzata. Non devono necessariamente essere presenti regioni costanti, ma se lo sono devono essere sostanzialmente identiche a

regioni costanti di immunoglobulina umana, ossia identiche per almeno l'85-90% circa, ad esempio circa il 95% o più. Pertanto, tutte le parti di un'immunoglobulina umanizzata, tranne eventualmente le CDR, sono sostanzialmente identiche a corrispondenti parti di sequenze di immunoglobulina umana naturale. Gli anticorpi umanizzati o monoclonali di altro tipo possono avere ulteriori sostituzioni conservative di amminoacidi, che sostanzialmente non avranno effetto sul legame all'antigene né su altre funzioni dell'immunoglobulina. Si possono costruire anticorpi umanizzati mediante ingegneria genetica (si veda ad esempio il Brevetto degli Stati Uniti n° 5,585,089).

In particolari realizzazioni il dominio di legame extracellulare di un CAR comprende un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene, tra cui a titolo non limitativo una Ig di camélide (un anticorpo (VHH di camélide), NAR di Ig, frammenti Fab, frammenti Fab', frammenti F(ab)'₂, frammenti F(ab)'₃, Fv, anticorpi Fv a singola catena ("scFv"), bis-scFv, (scFv)₂, minicorpi, diacorpi, triacorpi, tetracorpi, proteine Fv stabilizzate con disolfuro ("dsFv") e anticorpi a singolo dominio (sdAb, nanocorpi).

Per "Ig di camélide" o "VHH di camélide" ai presenti fini si intende la più piccola unità di legame

all'antigene nota di un anticorpo di catena pesante (Koch-Nolte et al., *FASEB J.* 21:3490-3498 (2007)). Per "anticorpo di catena pesante" o "anticorpo di camelide" si intende un anticorpo che contiene due domini VH e nessuna catena leggera (L. Riechmann et al., *J. Immunol. Methods* 231:25-38 (1999); WO94/04678; WO94/25591; Brevetto degli Stati Uniti n° 6,005,079). Per "NAR di Ig" o "nuovo recettore antigenico di immunoglobulina" si intende una classe di anticorpi dal repertorio immunitario degli squali consistenti di omodimeri di un dominio di nuovo recettore antigenico variabile (VNAR) e cinque domini di nuovi recettori antigenici costanti (CNAR). Le NAR di Ig rappresentano alcune delle più piccole impalcature proteiche a base di immunoglobulina note, sono altamente stabili e possiedono caratteristiche di legame efficienti. La stabilità intrinseca può essere attribuita sia a (i) l'impalcatura di Ig sottostante, che presenta un notevole numero di residui carichi e idrofili esposti in superficie in confronto con i domini VH e VL di anticorpi convenzionali riscontrati negli anticorpi murini; sia a (ii) attributi strutturali stabilizzanti nelle anse della regione determinante complementarità (CDR), compresi ponti disolfuro tra anse e motivi di legami a idrogeno entro le anse.

La digestione di anticorpi con papaina produce due frammenti di legame all'antigene identici detti frammenti "Fab", ognuno con un singolo sito di legame all'antigene, e un frammento "Fc" residuo il cui nome riflette la capacità di cristallizzare rapidamente. Il trattamento con pepsina fornisce un frammento $F(ab')_2$ che presenta due siti di combinazione di antigeni ed è ancora in grado di reticolare antigeni.

Un "Fv" è il minimo frammento di anticorpo che contiene un sito completo di legame all'antigene. In una realizzazione una specie Fv a due catene consiste di un dimero di un dominio variabile di catena pesante e uno di leggera in stretta associazione non covalente. In una specie Fv a singola catena (scFv) un dominio variabile di catena pesante e uno di leggera possono essere collegati covalentemente tramite un linker peptidico flessibile in maniera che le catene leggera e pesante possano associarsi in una struttura "dimerica" analogamente a quanto accade in una specie Fv a due catene. È in questa configurazione che le tre regioni ipervariabili (HVR) di ogni dominio variabile interagiscono a definire un sito di legame all'antigene sulla superficie del dimero VH-VL. Collettivamente le sei HVR conferiscono all'anticorpo specificità di legame all'antigene. Tuttavia anche un singolo dominio

variabile (o metà di un Fv comprendente solo 3 HVR specifiche per un antigene) ha la capacità di riconoscere e legare un antigene, seppure con affinità minore rispetto all'intero sito di legame.

Il frammento Fab contiene i domini variabili di catena pesante e leggera e contiene anche il dominio costante della catena leggera e il primo dominio costante (CH1) della catena pesante. I frammenti Fab' differiscono dai frammenti Fab per l'aggiunta di qualche residuo al terminale carbossilico del dominio CH1 della catena pesante comprendenti una o più cisteine dalla regione cerniera dell'anticorpo. La denominazione Fab'-SH si usa in questa sede per un Fab' in cui il residuo o i residui di cisteina dei domini costanti portano un gruppo tiolo libero. I frammenti di anticorpo F(ab')₂ si producevano originariamente come coppie di frammenti Fab' che presentavano cisteine cerniera tra sé. Sono noti anche altri accoppiamenti chimici di frammenti di anticorpo.

Il termine "diacorpi" indica frammenti di anticorpo con due siti di legame all'antigene, i quali frammenti comprendono un dominio variabile di catena pesante (VH) connesso a un dominio variabile di catena leggera (VL) nella stessa catena polipeptidica (VH-VL). Utilizzando un linker che sia troppo breve per

permettere l'accoppiamento tra i due domini sulla stessa catena i domini sono forzati ad accoppiarsi ai domini complementari di un'altra catena e creare due siti di legame all'antigene. I diacorpi possono essere bivalenti o bispecifici. Si descrivono diacorpi in maniera più completa tra gli altri in EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); e Hollinger et al., *PNAS USA* 90:6444-6448 (1993). Si descrivono inoltre triacorpi e tetracorpi in Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Per "anticorpo a singolo dominio" o "sdAb" o "nanocorpo" si intende un frammento di anticorpo composto dalla regione variabile di una catena pesante di anticorpo (dominio VH) o dalla regione variabile di una catena leggera di anticorpo (dominio VL) (L. Holt et al., *Trends in Biotechnology* 21(11):484-490).

I frammenti di anticorpo "Fv a singola catena" o "scFv" comprendono i domini VH e VL di un anticorpo, tali domini essendo presenti in una singola catena polipeptidica e in ambo gli orientamenti (vale a dire VL-VH o VH-VL). In generale il polipeptide scFv comprende ulteriormente tra i domini VH e VL un linker polipeptidico che permette al scFv di formare la struttura desiderata per il legame all'antigene. Per una rassegna di scFv, si veda ad esempio Pluckthün in *The*

Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, a cura di Rosenberg e Moore (Springer-Verlag, New York, 1994), pagg. 269-315.

In realizzazioni preferite un CAR qui contemplato comprende un dominio di legame specifico per antigene che è un scFv e che può essere un scFv murino, umano o umanizzato. Si possono clonare anticorpi a singola catena a partire da geni di regione V di un ibridoma specifico per un bersaglio desiderato. La produzione di tali ibridomi è diventata di routine. Una tecnica che può essere usata per clonare una catena pesante di regione variabile (V_H) e una catena leggera di regione variabile (V_L) è stata descritta ad esempio in Orlandi et al., *PNAS* 1989, 86:3833-3837. In particolari realizzazioni il dominio di legame specifico per l'antigene è un scFv che si lega a un polipeptide di catena leggera κ o λ . In una certa realizzazione il scFv si lega a un polipeptide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-

A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Muc1, Muc16, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2.

Un esempio di dominio di legame specifico per antigene umanizzato è una regione variabile di immunoglobulina specifica per un antigene tumorale comprendente almeno una regione cornice umana. Per "regione cornice umana" si intende una regione cornice selvatica (ossia esistente in natura) di una regione variabile di immunoglobulina umana, una regione cornice alterata di una regione variabile di immunoglobulina umana con meno del 50% circa (ad esempio preferibilmente meno del 45%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o 1% circa) degli amminoacidi nella regione deleti o sostituiti (ad esempio con uno o più residui amminoacidici di una regione cornice di immunoglobulina non umana a posizioni corrispondenti), oppure una regione cornice alterata di una regione variabile di immunoglobulina non umana con meno del 50% circa (ad esempio meno del 45%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% o 5% circa) degli amminoacidi nella regione deleti o sostituiti (ad esempio a posizioni di residui esposti e/o con uno o più residui amminoacidici di una regione cornice di immunoglobulina umana a posizioni corrispondenti),

così che in un aspetto l'immunogenicità sia ridotta. In certe realizzazioni una regione cornice umana è una regione cornice selvatica di una regione variabile di immunoglobulina umana. In certe altre realizzazioni una regione cornice umana è una regione cornice alterata di una regione variabile di immunoglobulina umana con delezioni o sostituzioni di amminoacidi in una, due, tre, quattro o cinque posizioni. In altre realizzazioni una regione cornice umana è una regione cornice alterata di una regione variabile di immunoglobulina non umana con delezioni o sostituzioni di amminoacidi in una, due, tre, quattro o cinque posizioni.

In particolari realizzazioni un dominio di legame specifico per l'antigene comprende almeno una, due, tre, quattro, cinque, sei, sette o otto regioni cornice umane (FR) selezionate tra FR1 di catena leggera umana, FR1 di catena pesante umana, FR2 di catena leggera umana, FR2 di catena pesante umana, FR3 di catena leggera umana, FR3 di catena pesante umana, FR4 di catena leggera umana e FR4 di catena pesante umana.

Le FR che possono essere presenti in un dominio di legame specifico per antigene includono inoltre varianti delle FR esemplificative fornite in questa sede in cui uno o due amminoacidi delle FR esemplificative siano stati sostituiti o deleti.

In certe realizzazioni un dominio di legame specifico per antigene umanizzato comprende (a) una regione variabile di catena leggera umanizzata che comprende una FR1 di catena leggera umana, una FR2 di catena leggera umana, una FR3 di catena leggera umana e una FR4 di catena leggera umana, e (b) una regione variabile di catena pesante umanizzata che comprende una FR1 di catena pesante umana, una FR2 di catena pesante umana, una FR3 di catena pesante umana e una FR4 di catena pesante umana.

I domini di legame specifici per antigene qui forniti includono inoltre una, due, tre, quattro, cinque o sei CDR. Tali CDR possono essere CDR non umane o CDR non umane alterate selezionate tra CDRL1, CDRL2 e CDRL3 della catena leggera e CDRH1, CDRH2 e CDRH3 della catena pesante. In certe realizzazioni un dominio di legame specifico per antigene comprende (a) una regione variabile di catena leggera che comprende una CDRL1 di catena leggera, una CDRL2 di catena leggera e una CDRL3 di catena leggera, e (b) una regione variabile di catena pesante che comprende una CDRH1 di catena pesante, una CDRH2 di catena pesante e una CDRH3 di catena pesante.

2. Linker

In certe realizzazioni i CAR qui contemplati possono

comprendere residui linker tra i vari domini, ad esempio tra domini V_H e V_L , aggiunti a scopo di appropriato distanziamento e conformazione della molecola. I CAR qui contemplati possono comprendere uno, due, tre, quattro o cinque o più linker. In particolari realizzazioni la lunghezza di un linker è compresa tra circa 1 e circa 25 amminoacidi, tra circa 5 e circa 20 amminoacidi, o tra circa 10 e circa 20 amminoacidi, o qualsiasi lunghezza intermedia di amminoacidi. In alcune realizzazioni il linker ha una lunghezza di 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o più amminoacidi. Gli esempi illustrativi di linker includono: polimeri di glicina $(G)_n$; polimeri di glicina-serina $(G_{1-5}S_{1-5})_n$ dove n è un intero pari ad almeno uno, due, tre, quattro o cinque; polimeri di glicina-alanina; polimeri di alanina-serina; e altri linker flessibili noti nel settore. I polimeri di glicina e di glicina-serina sono relativamente poco strutturati e quindi possono essere in grado di fungere da laccio neutro tra domini di proteine di fusione come i CAR descritti in questa sede. La glicina accede a uno spazio phi-psi significativamente maggiore rispetto anche all'alanina ed è molto meno ristretta rispetto a residui con catene laterali più lunghe (vedi Scheraga, *Rev. Computational*

Chem. 11173-142 (1992)). Gli operatori di normale competenza riconosceranno che la progettazione di un CAR in particolari realizzazioni può includere linker che siano flessibili in tutto o in parte, in modo che il linker possa includere un linker flessibile oltre a una o più porzioni che conferiscano una struttura meno flessibile per fornire una struttura di CAR desiderata.

Altri linker esemplificativi includono a titolo non limitativo le seguenti sequenze amminoacidiche: GGG; DGGGS (SEQ ID N° 4); TGEKP (SEQ ID N° 5) (vedi ad esempio Liu et al., *PNAS* 5525-5530 (1997)); GGRR (SEQ ID N° 6) (Pomerantz et al., 1995, sopraccitato); (GGGS)_n con n = 1, 2, 3, 4 o 5 (SEQ ID N° 7) (Kim et al., *PNAS* 93:1156-1160 (1996.)); EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID N° 8) (Chaudhary et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:1066-1070); KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID N° 9) (Bird et al., 1988, *Science* 242:423-426), GGRRGGGS (SEQ ID N° 10); LRQRDGERP (SEQ ID N° 11); LRQKDGGGSERP (SEQ ID N° 12); LRQKD(GGGS)₂ERP (SEQ ID N° 13). Alternativamente si possono progettare razionalmente linker flessibili con l'ausilio di un programma informatico in grado di modellare sia i siti di legame al DNA sia i peptidi stessi (Desjarlais e Berg, *PNAS* 90:2256-2260 (1993), *PNAS* 91:11099-11103 (1994)) o tramite metodi

a espressione su fago.

In particolari realizzazioni un CAR comprende un scFV che a sua volta include una sequenza di collegamento di regione variabile. Una "sequenza di collegamento di regione variabile" è una sequenza amminoacidica che connette una regione variabile di catena pesante con una regione variabile di catena leggera e svolge una funzione di distanziamento compatibile con l'interazione dei due sottodomini di legame in modo che il polipeptide risultante conservi un'affinità di legame specifica per la stessa molecola bersaglio di un anticorpo che includa le stesse regioni variabili di catena leggera e pesante. In una realizzazione la sequenza di collegamento della regione variabile ha una lunghezza di 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o più amminoacidi. In una particolare realizzazione la sequenza di collegamento della regione variabile comprende un polimero di glicina-serina $(G_{1-5}S_{1-5})_n$ con n intero pari ad almeno 1, 2, 3, 4, o 5. In un'altra realizzazione la sequenza di collegamento della regione variabile comprende un linker amminoacidico $(G_4S)_3$.

3. Dominio distanziatore

In particolari realizzazioni il dominio di legame del CAR è seguito da uno o più "domini distanziatori",

intesi come regione che allontana il dominio di legame all'antigene dalla superficie della cellula effettrice per permettere correttamente il contatto tra cellula e cellula, il legame all'antigene e l'attivazione (Patel et al., *Gene Therapy* 1999, 6:412-419). Il dominio cerniera può essere derivato da una fonte naturale, sintetica, semisintetica o ricombinante. In certe realizzazioni un dominio distanziatore è una porzione di un'immunoglobulina, comprese a titolo non limitativo una o più regioni costanti di catena pesante, ad esempio CH2 e CH3. Il dominio distanziatore può includere la sequenza amminoacidica di una regione cerniera di immunoglobulina esistente in natura o di una regione cerniera di immunoglobulina alterata.

In una realizzazione il dominio distanziatore comprende la CH2 e la CH3 di IgG1.

4. Dominio cerniera

Il dominio di legame del CAR è generalmente seguito da uno o più "domini cerniera", che giocano un certo ruolo nel posizionamento del dominio di legame all'antigene lontano dalla superficie della cellula effettrice per permettere correttamente il contatto tra cellula e cellula, il legame all'antigene e l'attivazione. Un CAR generalmente comprende uno o più domini cerniera tra il dominio di legame e il dominio transmembrana

(TM). Il dominio cerniera può essere derivato da una fonte naturale, sintetica, semisintetica o ricombinante. Il dominio cerniera può includere la sequenza amminoacidica di una regione cerniera di immunoglobulina esistente in natura o di una regione cerniera di immunoglobulina alterata.

Per regione cerniera "alterata" si intende (a) una regione cerniera esistente in natura con cambi di amminoacidi fino al 30% (ad esempio fino al 25%, 20%, 15%, 10% o 5% di sostituzioni o delezioni di amminoacidi), (b) una porzione di una regione cerniera esistente in natura con una lunghezza di almeno 10 amminoacidi (ad esempio almeno 12, 13, 14 o 15 amminoacidi) e fino al 30% di cambi di amminoacidi (ad esempio fino al 25%, 20%, 15%, 10% o 5% di sostituzioni o delezioni di amminoacidi), oppure (c) una porzione di una regione cerniera esistente in natura comprendente la regione cerniera del nocciolo (che può avere una lunghezza di 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, o di almeno 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 amminoacidi). In certe realizzazioni uno o più residui di cisteina in una regione cerniera di immunoglobulina esistente in natura possono essere sostituiti da uno o più altri residui amminoacidici (ad esempio uno o più residui di serina). Una regione cerniera di immunoglobulina

alterata può avere in alternativa o in aggiunta un residuo di prolina di una regione cerniera di immunoglobulina selvatica sostituito da un altro residuo amminoacidico (ad esempio un residuo di serina).

Altri domini cerniera illustrativi idonei per l'uso nei CAR qui descritti includono la regione cerniera derivata dalle regioni extracellulari di proteine della membrana di tipo 1 come CD8 α , CD4, CD28 e CD7, che possono essere regioni cerniera selvatiche da tali molecole o possono essere alterate. In un'altra realizzazione il dominio cerniera comprende una regione cerniera CD8 α .

5. Dominio transmembrana (TM)

Il "dominio transmembrana" è la porzione del CAR che fonde la porzione di legame extracellulare e il dominio intracellulare di segnalazione e ancora il CAR alla membrana del plasma della cellula effettrice immunitaria. Il dominio TM può essere derivato da fonte naturale, sintetica, semisintetica o ricombinante. Il dominio TM può essere derivato da (ovvero comprendere almeno la regione o regioni transmembrana di) la catena alfa, beta o zeta del recettore dei linfociti T, epsilon di CD3, zeta di CD3, CD4, CD5, CD9, CD16, CD22, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, PD-1 e CD154. In una particolare realizzazione

il dominio TM è sintetico e comprende per lo più residui idrofobi come leucina e valina.

In una realizzazione i CAR qui contemplati comprendono un dominio TM derivato da CD8 α . In un'altra realizzazione un CAR qui contemplato comprende un dominio TM derivato da CD8 α e un breve linker oligo- o polipeptidico preferibilmente di lunghezza tra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 amminoacidi che lega il dominio TM e il dominio intracellulare di segnalazione del CAR. Un linker glicina-serina fornisce un particolare linker idoneo.

6. Dominio di segnalazione intracellulare

In particolari realizzazioni i CAR qui contemplati comprendono un dominio intracellulare di segnalazione. Per "dominio intracellulare di segnalazione" si intende la parte di un CAR che partecipa nella trasduzione del messaggio dell'effettivo legame del CAR a un antigene bersaglio all'interno della cellula effettrice immunitaria per suscitare una funzione di cellula effettrice, ad esempio attivazione, produzione di citochine, proliferazione e attività citotossica, compreso il rilascio di fattori citotossici alla cellula bersaglio legata al CAR, o altre risposte cellulari suscitate con il legame dell'antigene al dominio extracellulare del CAR.

L'espressione "funzione effettrice" indica una funzione specializzata della cellula. La funzione effettrice di un linfocita T ad esempio può essere un'attività citolitica o un aiuto o un'attività che includa la secrezione di una citochina. L'espressione "dominio intracellulare di segnalazione" indica pertanto la porzione di una proteina che trasduce il segnale della funzione effettrice e che dirige la cellula a eseguire una funzione specializzata. Sebbene normalmente si possa utilizzare l'intero dominio intracellulare di segnalazione, in molti casi non è necessario usare tutto il dominio. Nell'eventualità che si usi una porzione troncata di un dominio intracellulare di segnalazione, tale porzione troncata può essere usata in luogo dell'intero dominio purché trasduca il segnale della funzione effettrice. L'espressione "dominio intracellulare di segnalazione" intende includere qualsiasi porzione troncata del dominio intracellulare di segnalazione che sia sufficiente a trasdurre il segnale della funzione effettrice.

È noto che i segnali generati attraverso la sola TCR sono insufficienti per una piena attivazione del linfocita T e che è richiesto anche un segnale secondario o co-stimolatore. Si può affermare quindi che l'attivazione dei linfociti T è mediata da due classi diverse

di domini intracellulari di segnalazione: i domini di segnalazione primari, che avviano l'attivazione primaria dipendente dall'antigene attraverso il TCR (ad esempio un complesso TCR/CD3), e i domini di segnalazione co-stimolatori, che agiscono in maniera indipendente dall'antigene per fornire un segnale secondario o co-stimolatore. In realizzazioni preferite un CAR qui contemplato comprende un dominio intracellulare di segnalazione che comprende uno o più "domini di segnalazione co-stimolatori" e un "dominio di segnalazione primario".

I domini di segnalazione primari regolano l'attivazione primaria del complesso TCR in modalità di stimolazione o in modalità di inibizione. I domini di segnalazione primari che agiscono in modalità di stimolazione possono contenere motivi di segnalazione noti come motivi di attivazione immunorecettori a base di tirosina o ITAM.

Gli esempi illustrativi di ITAM contenenti domini di segnalazione primari che sono particolarmente utili nell'invenzione includono quelli derivati da TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b e CD66d. In particolari realizzazioni preferite un CAR comprende un dominio di segnalazione primario CD3 ζ e uno o più domini di segnalazione co-stimolatori. I

domini intracellulari primari di segnalazione e quelli co-stimolatori di segnalazione possono essere collegati in qualsiasi ordine in tandem al terminale carbossilico del dominio transmembrana.

I CAR qui contemplati comprendono uno o più domini di segnalazione co-stimolatori per migliorare l'efficacia e l'espansione di linfociti T esprimenti recettori CAR. Ai presenti fini l'espressione "dominio di segnalazione co-stimolatore" o "dominio co-stimolatore" indica un dominio intracellulare di segnalazione di una molecola co-stimolatrice. Le molecole co-stimolatrici sono molecole della superficie cellulare diverse da recettori antigenici o recettori Fc che forniscono un secondo segnale richiesto per un'efficiente attivazione e funzione dei linfociti T una volta legati all'antigene. Gli esempi illustrativi di tali molecole co-stimolatrici includono CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS (CD278), CTLA4, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKD2C e CD83. In una realizzazione un CAR comprende uno o più domini di segnalazione co-stimolatori selezionati dal gruppo consistente di CD28, CD137 e CD134 e un dominio di segnalazione primario CD3 ζ .

In un'altra realizzazione un CAR comprende domini di segnalazione co-stimolatori CD28 e CD137 e un dominio

di segnalazione primario CD3 ζ .

In un'altra ulteriore realizzazione un CAR comprende domini di segnalazione co-stimolatori CD28 e CD134 e un dominio di segnalazione primario CD3 ζ .

In una realizzazione un CAR comprende domini di segnalazione co-stimolatori CD137 e CD134 e un dominio di segnalazione primario CD3 ζ .

In una realizzazione un CAR comprende un dominio di segnalazione co-stimolatore CD137 e un dominio di segnalazione primario CD3 ζ .

In una realizzazione un CAR comprende un dominio di segnalazione co-stimolatore CD134 e un dominio di segnalazione primario CD3 ζ .

In una realizzazione un CAR comprende un dominio di segnalazione co-stimolatore CD28 e un dominio di segnalazione primario CD3 ζ .

In particolari realizzazioni i CAR qui contemplati comprendono un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene che si lega specificamente a un polipeptide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3,

glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Muc1, Muc16, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2 espresso su una cellula tumorale.

In una realizzazione un CAR comprende un scFv che si lega a un polipeptide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Muc1, Muc16, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2; un dominio transmembrana derivato da un polipeptide selezionato dal gruppo consistente di CD8 α , CD4, CD45, PD1 e CD152; uno o più domini di segnalazione co-stimolatori intracellulari selezionati dal gruppo consistente di CD28, CD54, CD134, CD137, CD152, CD273, CD274 e CD278; e un dominio di segnalazione primario CD3 ζ .

In un'altra realizzazione un CAR comprende un scFv che si lega a un polipeptide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2; un dominio cerniera selezionato dal gruppo consistente di cerniera/ CH2/CH3 di IgG1 e CD8 α , e CD8 α ; un dominio transmembrana derivato da un polipeptide selezionato dal gruppo consistente di CD8 α , CD4, CD45, PD1 e CD152; uno o più domini di segnalazione co-stimolatori intracellulari selezionati dal gruppo consistente di CD28, CD134 e CD137; e un dominio di segnalazione primario CD3 ζ .

In un'altra ulteriore realizzazione un CAR comprende un scFv, comprendente ulteriormente un linker, che si lega a un polipeptide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a,

CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Muc1, Muc16, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2; un dominio cerniera selezionato dal gruppo consistente di cerniera/CH2/CH3 di IgG1 e CD8 α , e CD8 α ; un dominio transmembrana comprendente un dominio TM derivato da un polipeptide selezionato dal gruppo consistente di CD8 α , CD4, CD45, PD1 e CD152 e un breve linker oligo- o polipeptidico, preferibilmente di lunghezza tra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 amminoacidi che collega il dominio TM al dominio intracellulare di segnalazione del CAR; e uno o più domini di segnalazione co-stimolatori intracellulari selezionati dal gruppo consistente di CD28, CD134 e CD137; e un dominio di segnalazione primario CD3 ζ .

In una particolare realizzazione un CAR comprende un scFv che si lega a un polipeptide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171,

CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Muc1, Muc16, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2; un dominio cerniera comprendente un polipeptide cerniera PD1 o CD152; un dominio transmembrana PD1 o CD152 comprendente un linker polipeptidico di circa 3 amminoacidi; un dominio di segnalazione co-stimolatore intracellulare CD137; e un dominio di segnalazione primario CD3 ζ .

In una particolare realizzazione un CAR comprende un scFv che si lega a un polipeptide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Muc1,

Muc16, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2; un dominio cerniera comprendente un polipeptide cerniera PD1 o CD152; un dominio transmembrana PD1 o CD152 comprendente un linker polipeptidico di circa 3 amminoacidi; un dominio di segnalazione co-stimolatore intracellulare CD134; e un dominio di segnalazione primario CD3 ζ .

In una particolare realizzazione un CAR comprende un scFv che si lega a un polipeptide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Mucl, Muc16, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2; un dominio cerniera comprendente un polipeptide cerniera PD1 o CD152; un dominio transmembrana PD1 o CD152 comprendente un linker polipeptidico di circa 3 amminoacidi; un dominio di segnalazione co-stimolatore

intracellulare CD28; e un dominio di segnalazione primario CD3 ζ .

In una particolare realizzazione un CAR comprende un scFv che si lega a un polipeptide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α_2 , lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Mucl, Muc16, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2; un dominio cerniera comprendente un polipeptide cerniera/CH2/CH3 di IgG1 e un polipeptide CD8 α ; un dominio transmembrana CD8 α comprendente un linker polipeptidico di circa 3 amminoacidi; un dominio di segnalazione co-stimolatore intracellulare CD137; e un dominio di segnalazione primario CD3 ζ .

In una particolare realizzazione un CAR comprende un scFv che si lega a un polipeptide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6,

CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Muc1, Muc16, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2; un dominio cerniera comprendente un polipeptide CD8 α ; un dominio transmembrana CD8 α comprendente un linker polipeptidico di circa 3 amminoacidi; un dominio di segnalazione co-stimolatore intracellulare CD134; e un dominio di segnalazione primario CD3 ζ .

In una particolare realizzazione un CAR comprende un scFv che si lega a un polipeptide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Muc1,

Muc16, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2; un dominio cerniera comprendente un polipeptide CD8 α ; un dominio transmembrana CD8 α comprendente un linker polipeptidico di circa 3 amminoacidi; un dominio di segnalazione co-stimolatore intracellulare CD28; e un dominio di segnalazione primario CD3 ζ .

In aggiunta la progettazione dei vettori qui contemplati rende possibile una migliore espansione, persistenza a lungo termine e proprietà citotossiche in linfociti T, e un'espressione persistente dei CAR lungo la vita delle cellule in confronto con linfociti T non modificati o linfociti T modificati con altri vettori.

D. Polipeptidi

La presente invenzione contempla in parte polipeptidi CAR e loro frammenti, cellule e composizioni comprendenti gli stessi e vettori che esprimono polipeptidi. In realizzazioni preferite si fornisce un polipeptide comprendente uno o più CAR codificato da una sequenza polinucleotidica come presentata in SEQ ID N° 2 e 3. I termini "polipeptide", "frammento di polipeptide", "peptide" e "proteina" si usano in modo intercambiabile, salvo indicazione in senso contrario, e secondo il significato convenzionale, ossia come sequenza di

amminoacidi. I polipeptidi non sono limitati a una specifica lunghezza, per cui possono comprendere una sequenza proteica di lunghezza completa o un frammento di una proteina di lunghezza completa, e possono includere modifiche post-traduzionali del polipeptide, ad esempio glicosilazioni, acetilazioni, fosforilazioni e simili, oltre ad altre modifiche note nel settore, siano esse esistenti in natura o non esistenti in natura. In varie realizzazioni i polipeptidi CAR qui contemplati comprendono una sequenza segnale (o di testa) all'estremità N-terminale della proteina che dirige in ambito co-traduzionale o post-traduzionale il trasferimento della proteina. Gli esempi illustrativi di sequenze segnale idonee (peptidi segnale) utili nei CAR qui esposti includono a titolo non limitativo il polipeptide segnale della catena pesante di IgG1, un polipeptide segnale CD8 α o un peptide segnale del recettore alfa del GM-CSF umano. Si possono preparare polipeptidi con l'ausilio di una qualsiasi tra svariate tecniche ricombinanti e/o sintetiche ben note. I polipeptidi qui contemplati comprendono specificamente i CAR della presente esposizione, o sequenze che presentino delezioni da, aggiunte a e/o sostituzioni di uno o più amminoacidi di un CAR come qui descritto.

Un peptide "isolato" o un polipeptide "isolato" e simili, come usati in questa sede, indicano la depurazione e/o isolamento *in vitro* di una molecola di peptide o polipeptide da un ambiente cellulare e dall'associazione con altri componenti della cellula; vale a dire, esso non sarà significativamente associato con sostanze *in vivo*. Analogamente per cellula "isolata" si intende una cellula che sia stata ottenuta da un tessuto od organo *in vivo* e che sia sostanzialmente priva di matrice extracellulare.

I polipeptidi includono "varianti polipeptidiche". Le varianti polipeptidiche possono differire da un polipeptide esistente in natura per una o più sostituzioni, delezioni, aggiunte e/o inserzioni. Tali varianti possono essere esistenti in natura o possono essere generate sinteticamente, ad esempio modificando una o più delle sequenze polipeptidiche di cui sopra. Ad esempio, in particolari realizzazioni potrebbe essere desiderabile migliorare l'affinità di legame e/o altre proprietà biologiche dei CAR introducendo una o più sostituzioni, delezioni, aggiunte e/o inserzioni in un dominio di legame, dominio cerniera, dominio TM, dominio di segnalazione co-stimolatore o dominio di segnalazione primario di un polipeptide CAR. Di preferenza i polipeptidi dell'invenzione includono

polipeptidi aventi almeno circa 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% di identità di amminoacidi con essi.

I polipeptidi includono "frammenti polipeptidici". Per frammento polipeptidico si intende un polipeptide, che può essere monomero o multimerico, avente una delezione al terminale amminico, una delezione al terminale carbossilico e/o una delezione o sostituzione interna su un polipeptide esistente in natura o prodotto per via ricombinante. In certe realizzazioni un frammento polipeptidico può comprendere una catena amminoacidica lunga da almeno 5 a circa 500 amminoacidi. Si apprezzerà che in certe realizzazioni i frammenti hanno una lunghezza di almeno 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 450 amminoacidi. I frammenti polipeptidici particolarmente utili includono domini funzionali, compresi domini di legame ad antigeni o frammenti di anticorpi. Nel caso di un anticorpo di catena leggera anti-kappa o anti-lambda i frammenti utili includono a titolo non limitativo: una regione CDR, una regione CDR3 di catena pesante o leggera; una regione variabile di catena pesante o leggera; una

porzione di una catena di anticorpo o regione variabile comprendente due CDR; e simili.

Il polipeptide può inoltre essere fuso in quadro o coniugato con un linker o altra sequenza per facilità di sintesi, purificazione o identificazione del polipeptide (ad esempio poli-His) o per potenziare il legame del polipeptide a un supporto solido.

Come osservato qui sopra i polipeptidi dell'invenzione possono essere alterati in vari modi, comprese sostituzioni, delezioni, troncamenti e inserzioni di amminoacidi. Nel settore sono generalmente noti metodi per tali manipolazioni. Ad esempio si possono preparare varianti di sequenze amminoacidiche di un polipeptide di riferimento tramite mutazioni nel DNA. Nel settore sono ben noti metodi per la mutagenesi e per l'alterazione di sequenze nucleotidiche. Si vedano ad esempio Kunkel (1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492), Kunkel et al., (1987, *Methods in Enzymol.* 154:367-382), il Brevetto degli Stati Uniti n° 4,873,192; J.D. Watson et al. (*Molecular Biology of the Gene*, quarta edizione, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) e i riferimenti ivi citati. Per trovare una guida sulle appropriate sostituzioni di amminoacidi che non influiscono sull'attività biologica della proteina di interesse si rimanda al

modello di Dayhoff et al. (1978), Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).

In certe realizzazioni una variante conterrà sostituzioni conservative. Una "sostituzione conservativa" è una in cui si sostituisce un amminoacido in luogo di un altro amminoacido avente proprietà simili, in un modo tale che gli esperti del settore della chimica dei peptidi prevedano che la struttura secondaria e la natura idropatica del polipeptide rimangano sostanzialmente invariate. Si possono apportare modifiche alla struttura dei polinucleotidi e dei polipeptidi della presente invenzione e ottenere comunque una molecola funzionale che codifichi un polipeptide variante o derivato con caratteristiche desiderabili. Quando si desidera alterare la sequenza amminoacidica di un polipeptide per creare un polipeptide variante equivalente (o anche migliorato) dell'invenzione, gli esperti del settore ad esempio potranno cambiare uno o più dei codoni della sequenza di DNA codificante, ad esempio in base alla tabella 1.

Tabella 1 - Codoni per amminoacidi

Amminoacido	Codice a una lettera	Codice a tre lettere	Codoni			
Alanina	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCU
Cisteina	C	Cys	UGC	UGU		

Acido aspartico	D	Asp	GAC	GAU				
Acido glutammico	E	Glu	GAA	GAG				
Fenilalanina	F	Phe	UUC	UUU				
Glicina	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGU		
Istidina	H	His	CAC	CAU				
Isoleucina	I	Iso	AUA	AUC	AUU			
Lisina	K	Lys	AAA	AAG				
Leucina	L	Leu	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Metionina	M	Met	AUG					
Asparagina	N	Asn	AAC	AAU				
Prolina	P	Pro	CCA	CCC	CCG	CCU		
Glutammina	Q	Gln	CAA	CAG				
Arginina	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Serina	S	Ser	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Treonina	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACU		
Valina	V	Val	GUA	GUC	GUG	GUU		
Triptofano	W	Trp	UGG					
Tirosina	Y	Tyr	UAC	UAU				

Per trovare una guida nella determinazione di quali residui amminoacidici possano essere sostituiti, inseriti o deleti senza sopprimere l'attività biologica si possono utilizzare programmi informatici ben noti nel settore, come il software DNASTAR™. Di preferenza i cambi di amminoacidi nelle varianti di proteina qui esposte sono cambi di amminoacidi conservativi, vale a dire sostituzioni di amminoacidi analogamente carichi o non carichi. Un cambio conservativo di amminoacidi comporta la sostituzione di uno tra una famiglia di amminoacidi che siano affini nelle loro catene laterali.

Gli aminoacidi esistenti in natura sono generalmente divisi in quattro famiglie: aminoacidi acidi (aspartato, glutammato), basici (lisina, arginina, istidina), non polari (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano) e polari senza carica (glicina, asparagina, glutammina, cisteina, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, il triptofano e la tirosina sono talvolta classificati congiuntamente come aminoacidi aromatici. In un peptide o una proteina le idonee sostituzioni conservative di aminoacidi sono note agli esperti di questo settore e generalmente possono essere apportate senza alterare un'attività biologica di una molecola risultante. Gli esperti del settore riconosceranno che in generale singole sostituzioni di aminoacidi in regioni non essenziali di un polipeptide non alterano sostanzialmente l'attività biologica (vedi ad esempio Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4^a edizione, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pag. 224). Si descrivono esempi di sostituzioni conservative nella Domanda Provvisoria di Brevetto degli Stati Uniti n° 61/241,647, la cui esposizione si incorpora per riferimento nella presente.

Nell'apportare tali modifiche si può tenere conto dell'indice idropatico degli aminoacidi. L'importanza

dell'indice idropatico di un amminoacido nel conferire una funzione biologica interattiva a una proteina è generalmente compresa nel settore (Kyte e Doolittle, 1982, incorporato per riferimento nella presente). A ogni amminoacido è stato assegnato un indice idropatico in base alle sue caratteristiche di idrofobia e carica (Kyte e Doolittle, 1982). Tali valori sono: isoleucina +4,5; valina +4,2; leucina +3,8; fenilalanina +2,8; cisteina/cisteina +2,5; metionina +1,9; alanina +1,8; glicina -0,4; treonina -0,7; serina -0,8; triptofano -0,9; tirosina -1,3; prolina -1,6; istidina -3,2; glutammato -3,5; glutammina -3,5; aspartato -3,5; asparagina -3,5; lisina -3,9; arginina -4,5.

È noto nel settore che certi amminoacidi possono essere sostituiti da altri amminoacidi aventi un indice o punteggio idropatico simile e dare luogo comunque a una proteina con attività biologica simile, ovvero ottenere ancora una proteina funzionalmente equivalente in senso biologico. Nell'apportare tali modifiche si preferiscono sostituzioni di amminoacidi i cui indici idropatici rientrino entro ± 2 , si preferiscono particolarmente quelli entro ± 1 , e si preferiscono ancora più particolarmente quelli entro $\pm 0,5$. Nel settore è inoltre noto che la sostituzione di amminoacidi simili

può essere eseguita effettivamente in base all'idrofilia.

Come riportato in dettaglio nel Brevetto degli Stati Uniti n° 4,554,101, ai residui amminoacidici sono stati assegnati i seguenti valori di idrofilia: arginina +3,0; lisina +3,0; aspartato +3,0 ± 1; glutammato +3,0 ± 1; serina +0,3; asparagina +0,2; glutammina +0,2; glicina 0; treonina -0,4; prolina -0,5 ± 1; alanina -0,5; istidina -0,5; cisteina -1,0; metionina -1,3; valina -1,5; leucina -1,8; isoleucina -1,8; tirosina -2,3; fenilalanina -2,5; triptofano -3,4. Resta inteso che si può sostituire un amminoacido in luogo di un altro avente un valore di idrofilia simile e ottenere ancora una proteina biologicamente equivalente, e in particolare immunologicamente equivalente. In tali cambi si preferiscono sostituzioni di amminoacidi i cui valori di idrofilia rientrano entro ±2, si preferiscono particolarmente quelli entro ±1, e si preferiscono ancora più particolarmente quelli entro ±0,5.

Come sopra accennato le sostituzioni di amminoacidi possono essere basate sulla similitudine relativa dei sostituenti nelle catene laterali degli amminoacidi, ad esempio la loro idrofobia, idrofilia, carica, dimensione e simili.

Le varianti di polipeptidi includono ulteriormente forme glicosilate, coniugati aggregativi con altre molecole e coniugati covalenti con frazioni chimiche non affini (ad esempio molecole PEGilate). Si possono preparare varianti covalenti collegando funzionalità a gruppi che si trovino nella catena dell'amminoacido o a residui al terminale N o C come noto nel settore. Le varianti includono inoltre varianti alleliche, varianti di specie e muteine. I troncamenti o delezioni di regioni che non influiscono sull'attività funzionale delle proteine sono anch'esse varianti.

In una realizzazione, ove si desideri l'espressione di due o più polipeptidi le sequenze polinucleotidiche che li codificano possono essere separate da una sequenza IRES come discusso altrove in questa sede. In un'altra realizzazione si possono esprimere due o più polipeptidi come proteina di fusione che comprenda una o più sequenze polipeptidiche autoclivanti.

I polipeptidi della presente invenzione includono polipeptidi di fusione. In realizzazioni preferite si forniscono polipeptidi di fusione e polinucleotidi codificanti polipeptidi di fusione, ad esempio CAR. Per polipeptide di fusione o proteina di fusione si intende un polipeptide avente almeno due, tre, quattro, cinque, sei, sette, otto, nove o dieci o più segmenti di

polipeptide. I polipeptidi di fusione sono tipicamente collegati dal terminale C al terminale N, pure se possono essere collegati anche dal terminale C al terminale C, dal terminale N al terminale N, o dal terminale N al terminale C. I polipeptidi della proteina di fusione possono trovarsi in qualsiasi ordine o in un ordine specificato. I polipeptidi di fusione o proteine di fusione possono inoltre includere varianti modificate in senso conservativo, varianti polimorfiche, alleli, mutanti, sottosequenze e omologhi interspecie, purché l'attività trascrizionale del polipeptide di fusione sia mantenuta. Si possono produrre polipeptidi di fusione tramite metodi chimici sintetici o per collegamento chimico tra le due frazioni, oppure si possono preparare in generale con l'ausilio di altre tecniche standard. Le sequenze di DNA legate comprendenti il polipeptide di fusione vengono operativamente collegate a idonei elementi di controllo della trascrizione o della traduzione come discusso altrove in questa sede.

In una realizzazione un partner di fusione comprende una sequenza che assiste nell'espressione della proteina (un potenziatore dell'espressione) con rese maggiori rispetto alla proteina ricombinante nativa. Si possono selezionare altri partner di fusione in

maniera da aumentare la solubilità della proteina o permettere alla proteina di essere puntata contro i compartimenti intracellulari desiderati, o per facilitare il trasporto della proteina di fusione attraverso la membrana cellulare.

I polipeptidi di fusione possono ulteriormente comprendere un segnale di clivaggio di polipeptidi tra ciascuno dei domini polipeptidici qui descritti. In aggiunta il sito polipeptidico può essere introdotto in qualsiasi sequenza peptidica linker. Gli esempi di segnali di clivaggio di polipeptidi includono siti di riconoscimento di clivaggio di polipeptidi come siti di clivaggio di proteasi, siti di clivaggio di nucleasi (ad esempio siti di riconoscimento di enzimi di restrizione rari, o siti di riconoscimento di ribozimi autoclivanti) e oligopeptidi virali autoclivanti (vedi deFelipe e Ryan, 2004, *Traffic* 5(8):616-26).

Agli esperti del settore sono noti idonei siti di clivaggio di proteasi e peptidi autoclivanti (si veda ad esempio in Ryan et al., 1997, *J. Gener. Virol.* 78:699-722; o Scymczak et al., 2004, *Nature Biotech.* 5:589-594). Gli esempi di siti di clivaggio di proteasi includono a titolo non limitativo i siti di clivaggio delle proteasi del potivirus NIa (ad esempio la proteasi del virus del mosaico del tabacco), proteasi del

potivirus HC, proteasi del potivirus P1 (P35), proteasi del byovirus NIa, proteasi codificate da byovirus RNA-2, proteasi dell'aftovirus L, proteasi dell'enterovirus 2A, proteasi del rinovirus 2A, proteasi del picornavirus 3C, proteasi del comovirus 24K, proteasi del nepovirus 24K, proteasi del RTSV (virus tungro sferico del riso) simile a 3C, proteasi del PYVF (virus delle chiazze gialle della pastinaca) simile a 3C, eparina, trombina, fattore Xa ed enterochinasi. In ragione della loro elevata stringenza di clivaggio, in una realizzazione si preferiscono siti di clivaggio della proteasi del TEV (virus del mosaico), ad esempio EXXYXQ(G/S) (SEQ ID N° 14), e ad esempio ENLYFQG (SEQ ID N° 15) e ENLYFQS (SEQ ID N° 16), dove X rappresenta qualsiasi amminoacido (il clivaggio tramite TEV avviene tra Q e G o tra Q e S).

In una particolare realizzazione i peptidi autoclivanti includono le sequenze polipeptidiche ottenute da peptidi di potivirus e cardiovirus 2A, FMDV (virus della malattia del piede e della testa), virus della rinite A equina, virus di *Thosea asigna* e tescovirus suino.

In certe realizzazioni il sito del polipeptide autoclivante comprende un sito, sequenza o dominio 2A o simile a 2A (Donnelly et al., 2001. *J. Gen. Virol.* 82:1027-

1041).

Tabella 2: Esempi di siti 2A e sequenze incluse in essi

SEQ ID N° 17	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID N° 18	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID N° 19	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID N° 20	NFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID N° 21	QLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID N° 22	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID N° 23	VTELLYRMKRAETYCPRLLAIHPTPEARHKQKIVAPVKQT
SEQ ID N° 24	LNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID N° 25	LLAIHPTPEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID N° 26	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

In realizzazioni preferite un polipeptide qui contemplato comprende un polipeptide CAR.

E. Polinucleotidi

In particolari realizzazioni si forniscono polinucleotidi comprendenti un promotore MND e un polinucleotide codificante uno o più CAR. In realizzazioni preferite si fornisce un polinucleotide comprendente un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide codificante uno o più CAR come presentati nelle SEQ ID N° 2 e 3. Ai presenti fini i termini "polinucleotide" o "acido nucleico" indicano RNA messaggero (mRNA), RNA, RNA genomico (gRNA), RNA a filamento positivo (RNA(+)), RNA a filamento negativo (RNA(-)), DNA genomico (gDNA), DNA complementare (cDNA) o DNA

ricombinante. I polinucleotidi includono polinucleotidi a singolo e a doppio filamento. Preferibilmente i polinucleotidi dell'invenzione includono polinucleotidi o varianti aventi almeno circa il 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza con una qualsiasi delle sequenze di riferimento qui descritte (si veda ad esempio il listato delle sequenze), tipicamente in cui la variante mantiene almeno un'attività biologica della sequenza di riferimento.

In varie realizzazioni illustrative la presente invenzione contempla in parte polinucleotidi comprendenti vettori di espressione, vettori virali e plasmidi di trasferimento, e composizioni e cellule comprendenti gli stessi.

In particolari realizzazioni in questa invenzione si forniscono polinucleotidi che codificano almeno circa 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1000, 1250, 1500, 1750 o 2000 o più residui amminoacidici contigui di un polipeptide dell'invenzione, oltre a tutte le lunghezze intermedie. Si comprenderà facilmente come per "lunghezze intermedie" in questo contesto si intenda qualsiasi lunghezza compresa tra i valori citati, come 6, 7, 8, 9, eccetera, 101, 102, 103, eccetera; 151, 152, 153, eccetera; 201, 202, 203, eccetera.

Ai presenti fini i termini "variante di polinucleotide" e "variante" e simili indicano polinucleotidi che evidenziano sostanziale identità di sequenza con una sequenza polinucleotidica di riferimento o polinucleotidi che si ibridano con una sequenza di riferimento sotto condizioni stringenti come definite qui di seguito. Questi termini includono polinucleotidi in cui uno o più nucleotidi siano stati aggiunti o deleti, oppure sostituiti con nucleotidi differenti in confronto con un polinucleotide di riferimento. A tale proposito, nel settore è ben noto che si possono apportare certe alterazioni, comprese mutazioni, aggiunte, delezioni e sostituzioni, a un polinucleotide di riferimento tali che il polinucleotide alterato mantenga l'attività o funzione biologica del polinucleotide di riferimento.

Le enunciazioni "identità di sequenza", o ad esempio "comprendente una sequenza identica per il 50% a", come usate in questa sede, indicano l'entità per la quale le sequenze sono identiche su base nucleotide per nucleotide o su base amminoacido per amminoacido su una finestra di confronto. Una "percentuale di identità di sequenza" potrà pertanto essere calcolata confrontando due sequenze allineate in modo ottimale sulla finestra di confronto, determinando il numero di

posizioni alle quali si ha una base di acido nucleico identica (ad esempio A, T, C, G, I) o un residuo amminoacidico identico (ad esempio Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys o Met) in entrambe le sequenze per ottenere il numero di posizioni combacianti, dividendo il numero di posizioni combacianti per il numero totale di posizioni nella finestra di confronto (ossia la dimensione della finestra) e moltiplicando il risultato per 100 per ottenere la percentuale di identità di sequenza. Si includono nucleotidi e polipeptidi aventi almeno circa il 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza con una qualsiasi delle sequenze di riferimento qui descritte, tipicamente in cui la variante del polipeptide mantiene almeno un'attività biologica del polipeptide di riferimento.

I termini usati per descrivere relazioni di sequenza tra due o più polinucleotidi o polipeptidi includono "sequenza di riferimento" "finestra di confronto", "identità di sequenza", "percentuale di identità di sequenza" e "identità sostanziale". Una "sequenza di riferimento" avrà una lunghezza di almeno 12 ma sovente da 15 a 18 e spesso almeno 25 unità monomeriche, comprendenti nucleotidi e residui amminoacidici. Dato che

due polinucleotidi possono comprendere ciascuno (1) una sequenza (ovvero solo una porzione della sequenza polinucleotidica completa) che sia simile tra i due polinucleotidi, e (2) una sequenza che sia divergente tra i due polinucleotidi, i confronti di sequenza tra due (o più) polinucleotidi si eseguono tipicamente confrontando sequenze dei due polinucleotidi su una "finestra di confronto" per identificare e confrontare regioni locali di similarità di sequenza. Per "finestra di confronto" si intende un segmento immaginario di almeno 6 posizioni contigue, in genere da circa 50 a circa 100 e più solitamente da circa 100 a circa 150, in cui si confronta una sequenza con una sequenza di riferimento dello stesso numero di posizioni contigue dopo avere allineato in senso ottimale le due sequenze. La finestra di confronto può comprendere aggiunte o delezioni (ossia lacune) per circa il 20% o meno in confronto con la sequenza di riferimento (che non comprende aggiunte o delezioni) a scopo di allineamento ottimale delle due sequenze. Un allineamento ottimale di sequenze a scopo di allineamento di una finestra di confronto può essere effettuato tramite implementazioni computerizzate di algoritmi (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA in Wisconsin Genetics Software Package, release 7.0, da Genetics Computer

Group di 575 Science Drive, Madison, WI, Stati Uniti) oppure via ispezione e migliore allineamento (ossia quello che dà luogo alla massima omologia percentuale sulla finestra di confronto) generato tramite uno qualsiasi tra i vari metodi selezionati. Si potrà inoltre fare riferimento alla famiglia di programmi BLAST, come esposti ad esempio da Altschul et al., 1997, *Nucl. Acids Res.* 25:3389. Per una discussione dettagliata dell'analisi di sequenze si rimanda all'unità 19.3 in Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, capitolo 15.

Ai presenti fini per polinucleotide "isolato" si intende un polinucleotide che sia stato depurato dalle sequenze che lo affiancano in uno stato esistente in natura, ad esempio un frammento di DNA che sia stato rimosso dalle sequenze che sono normalmente adiacenti al frammento. Per polinucleotide "isolato" si intendono inoltre un DNA complementare (cDNA), un DNA ricombinante, o un altro polinucleotide che non esista in natura e che sia stato creato per mano dell'uomo.

I termini che descrivono l'orientamento dei polinucleotidi includono 5' (normalmente l'estremità del polinucleotide avente un gruppo fosfato libero) e 3' (normalmente l'estremità del polinucleotide avente un

gruppo idrossile (OH) libero). Le sequenze polipeptidiche possono essere annotate nell'orientamento da 5' a 3' o nell'orientamento da 3' a 5'. Per il DNA e l'mRNA il filamento da 5' a 3' è designato filamento "senso", "positivo" o "di codifica" perché la sua sequenza è identica alla sequenza del pre-messaggero (pre-mRNA) (tranne per la presenza di uracile (U) nell'RNA in luogo della timina (T) del DNA). Per il DNA e l'mRNA il filamento da 3' a 5' complementare, che è il filamento trascritto dalla RNA polimerasi, è designato filamento "stampo", "antisenso", "negativo" o "non di codifica". Ai presenti fini l'espressione "orientamento inverso" indica una sequenza da 5' a 3' scritta nell'orientamento da 3' a 5' o una sequenza da 3' a 5' scritta nell'orientamento da 5' a 3'.

I termini "complementare" e "complementarità" indicano polinucleotidi (ossia una sequenza di nucleotidi) in relazione alle regole di accoppiamento di basi. Ad esempio il filamento complementare della sequenza di DNA data da 5' A G T C A T G 3' è 3' T C A G T A C 5'. Quest'ultima sequenza si scrive frequentemente come complemento inverso con l'estremità 5' a sinistra e l'estremità 3' a destra: 5' C A T G A C T 3'. Una sequenza uguale al suo complemento inverso si dice sequenza palindroma. La complementarità può essere "parziale",

in cui solo alcune delle basi degli acidi nucleici sono abbinate in accordo con le regole di accoppiamento di basi, oppure può essere una complementarità "completa" o "totale" tra gli acidi nucleici.

I comuni esperti del settore apprezzeranno inoltre che come conseguenza della degenerazione del codice genetico esistono molte sequenze nucleotidiche che codificano un polipeptide, o relativo frammento o variante, come si descrive in questa sede. Alcuni di tali polinucleotidi esibiscono un'omologia minima con la sequenza di nucleotidi di un qualsiasi gene nativo. Ciononostante, nella presente invenzione si contemplano specificamente polinucleotidi che variano in ragione di differenze nell'uso di codoni, ad esempio polinucleotidi che siano ottimizzati per la selezione di codoni in esseri umani e/o primati. In aggiunta si possono usare anche alleli dei geni che costituiscono le sequenze polinucleotidiche qui fornite. Gli alleli sono geni endogeni che vengono alterati come conseguenza di una o più mutazioni, come delezioni, aggiunte e/o sostituzioni di nucleotidi.

Il termine "cassetta di acido nucleico" ai presenti fini indica sequenze genetiche all'interno di un vettore che possono esprimere un RNA e successivamente una proteina. La cassetta di acido nucleico contiene

un promotore e un gene di interesse, ad esempio CAR. La cassetta di acido nucleico è posizionalmente e sequenzialmente orientata all'interno del vettore in maniera tale che l'acido nucleico nella cassetta possa essere trascritto in RNA, e se necessario traslato in una proteina o in un polipeptide, subire appropriate modifiche post-traduzionali richieste per l'attività nella cellula trasformata, ed essere spostato al compartimento appropriato per l'attività biologica via targeting su appropriati compartimenti intracellulari o secrezione in compartimenti extracellulari. Di preferenza la cassetta ha le sue estremità 3' e 5' adattate per una facile inserzione in un vettore, ad esempio presenta siti di endonucleasi di restrizione a ciascuna estremità. In una realizzazione preferita dell'invenzione la cassetta di acido nucleico contiene la sequenza di un promotore MND e un recettore antigenico chimerico qui contemplato. La cassetta può essere rimossa e inserita in un plasmide o vettore virale come singola unità.

In particolari realizzazioni i polinucleotidi includono almeno un polinucleotide di interesse. Ai presenti fini l'espressione "polinucleotide di interesse" si riferisce a un polinucleotide che codifica un polipeptide (ad esempio un polipeptide di interesse)

inserito in un vettore di espressione che si desidera esprimere. Un vettore può comprendere 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 polinucleotidi di interesse. In certe realizzazioni il polinucleotide di interesse codifica un polipeptide che fornisce un effetto terapeutico nel trattamento o nella prevenzione di una malattia o disturbo. I polinucleotidi di interesse e i polipeptidi codificati a partire da essi includono sia polinucleotidi che codificano polipeptidi selvatici sia varianti funzionali e relativi frammenti. In particolari realizzazioni una variante funzionale ha almeno l'80%, almeno il 90%, almeno il 95% o almeno il 99% di identità con una corrispondente sequenza polinucleotidica o polipeptidica selvatica di riferimento. In certe realizzazioni una variante o frammento funzionale presenta almeno il 50%, almeno il 60%, almeno il 70%, almeno l'80% o almeno il 90% di un'attività biologica di un corrispondente polipeptide selvatico.

In una realizzazione il polinucleotide di interesse non codifica un polipeptide ma piuttosto funge da stampo per trascrivere miRNA, siRNA oppure shRNA, ribozima o altro RNA inibitore. In varie altre realizzazioni un polinucleotide comprende un polinucleotide di interesse che codifica un CAR e uno o più ulteriori polinucleotidi di interesse, tra cui a titolo non

limitativo una sequenza inibitrice di acidi nucleici, compresi a titolo non limitativo un siRNA, un miRNA, un shRNA e un ribozima.

Ai presenti fini i termini "siRNA" o "breve RNA interferente" indicano una breve sequenza polinucleotidica che media un processo di silenziamento genico post-trascrizionale specifico per sequenza, l'inibizione traduzionale o l'inibizione trascrizionale, o RNAi epigenetico negli animali (Zamore et al., 2000, *Cell* 101:25-33; Fire et al., 1998, *Nature* 391:806; Hamilton et al., 1999, *Science* 286:950-951; Lin et al., 1999, *Nature* 402:128-129; Sharp, 1999, *Genes & Dev.* 13:139-141; e Strauss, 1999, *Science* 286:886). In certe realizzazioni un siRNA comprende un primo filamento e un secondo filamento che hanno lo stesso numero di nucleosidi, ma il primo e il secondo filamento sono sfalsati, in modo che i due nucleosidi terminali sul primo e sul secondo filamento non siano accoppiati con un residuo sul filamento complementare. In certe istanze i due nucleosidi che non sono accoppiati sono residui di timidina. Il siRNA dovrà includere una regione di omologia sufficiente con il gene bersaglio e avere lunghezza sufficiente in termini di nucleotidi, così che il siRNA o un relativo frammento possa mediare la down-regolazione del gene bersaglio. Di conseguenza

un siRNA include una regione almeno parzialmente complementare al RNA bersaglio. Non deve necessariamente aversi perfetta complementarità tra il siRNA e il bersaglio, ma la corrispondenza dovrà essere sufficiente a permettere al siRNA, o a un relativo prodotto di clivaggio, di dirigere il silenziamento specifico per sequenza, ad esempio per clivaggio con RNAi dell'RNA bersaglio. La complementarità, o grado di omologia con il filamento bersaglio, è più critica nel filamento antisenso.

Pure se spesso si desidera perfetta complementarità, in particolare nel filamento antisenso, alcune realizzazioni includono uno o più ma preferibilmente 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o meno discrepanze rispetto al RNA bersaglio. Le discrepanze sono tollerate al massimo nelle regioni terminali, e se presenti si trovano preferibilmente in una regione o in regioni terminali, ad esempio entro 6, 5, 4 o 3 nucleotidi dal capo 5' e/o 3'. Il filamento senso dovrà soltanto essere complementare con il filamento antisenso abbastanza da mantenere il carattere complessivo a doppio filamento della molecola.

In aggiunta un siRNA può essere modificato o includere analoghi nucleosidici. Le regioni a singolo filamento di un siRNA possono essere modificate o includere analoghi nucleosidici; ad esempio la regione o regioni

non accoppiate di una struttura a forcina, ad esempio una regione che colleghi due regioni complementari, può avere modifiche o analoghi nucleosidici. Sono utili anche modifiche mirate a stabilizzare uno o più capi 3' o 5' di un siRNA, ad esempio contro esonucleasi, o a favorire l'entrata dell'agente con siRNA antisenso nel RISC. Le modifiche possono includere linker amminici C3 (o C6, C7, C12), linker tiolici, linker carbossilici, distanziatori non nucleotidici (C3, C6, C9, C12, abasici, glicole trietilenico, glicole esaetilenico) o speciali reagenti con biotina o fluoresceina esistenti in forma di fosforamiditi e aventi un altro gruppo idrossile protetto da DMT, così da rendere possibili multipli accoppiamenti durante la sintesi dell'RNA. Ciascun filamento di un siRNA può avere una lunghezza pari o inferiore a 30, 25, 24, 23, 22, 21 o 20 nucleotidi. Di preferenza il filamento ha una lunghezza di almeno 19 nucleotidi. Ad esempio ciascun filamento può avere una lunghezza compresa tra 21 e 25 nucleotidi. I siRNA preferiti hanno una regione duplex di 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 coppie di nucleotidi e uno o più sbalzi di 2-3 nucleotidi, preferibilmente uno o due sbalzi all'estremo 3' con 2-3 nucleotidi.

Ai presenti fini il termine "miRNA" o "microRNA" indica

piccoli RNA non codificanti di 20-22 nucleotidi, tipicamente escissi da strutture precorritrici di RNA da reversione di circa 70 nucleotidi note come pre-miRNA. I miRNA regolano negativamente i loro bersagli in uno tra due modi a seconda del grado di complementarità tra il miRNA e il bersaglio. Anzitutto i miRNA che si legano con complementarità perfetta o quasi perfetta a sequenze di mRNA codificanti proteina inducono la via di interferenza mediata da RNA (RNAi). I miRNA che esercitano i loro effetti regolatori tramite legame a siti complementari imperfetti entro le regioni non tradotte (UTR) al capo 3' dei loro bersagli di mRNA reprimono in sede post-trascrizionale l'espressione del gene bersaglio, a quanto pare a livello di traduzione, mediante un complesso RISC simile o eventualmente anche identico con quello usato per la via RNAi. Coerentemente con il controllo traduzionale i miRNA che usano questo meccanismo riducono i livelli di proteina dei loro geni bersaglio, anche se i livelli di mRNA di tali geni ne sono colpiti solo in misura minima. I miRNA comprendono sia miRNA esistenti in natura sia miRNA progettati artificialmente che possano specificamente puntare qualsiasi sequenza di mRNA. Ad esempio in una realizzazione coloro che sono competenti nell'arte sapranno progettare brevi

costrutti di RNA a forcina espressi come trascritti primari di miRNA umano (ad esempio miR-30 o miR-21). Questa progettazione aggiunge un sito di elaborazione Drosha al costrutto a forcina, ed è stata dimostrata aumentare di molto l'efficacia di knockdown (Pusch et al., 2004). Il gambo della forcina consiste di 22 nucleotidi di dsRNA (ad esempio l'antisense ha perfetta complementarità con il bersaglio desiderato) e di un'ansa di 15-19 nucleotidi da un miR umano. Aggiungendo l'ansa miR e le sequenze di affiancamento miR30 su uno o su ambo i lati della forcina si ottiene come risultato un aumento di oltre 10 volte nell'elaborazione di Drosha e Dicer delle forcine espresse in confronto con progettazioni di shRNA convenzionali senza microRNA. Un'elaborazione di Drosha e Dicer migliorata si traduce in una maggiore produzione di siRNA/miRNA e in una maggiore potenza per le forcine espresse.

Ai presenti fini il termine "shRNA" o "breve RNA a forcina" indica una struttura a doppio filamento costituita da un singolo filamento di RNA autocomplementare. A scopo di inibizione si preferiscono costrutti di shRNA contenenti una sequenza nucleotidica identica a una porzione di una sequenza di codifica o non di codifica del gene bersaglio. Anche sequenze di RNA con

inserzioni, delezioni e mutazioni a singolo punto rispetto alla sequenza bersaglio sono state riscontrate essere efficaci per l'inibizione. Si preferisce un'identità di sequenza maggiore del 90% o anche un'identità di sequenza del 100% tra l'RNA inibitore e la porzione del gene bersaglio. In certe realizzazioni preferite la lunghezza della porzione che forma il duplex di un shRNA misura almeno 20, 21 o 22 nucleotidi in lunghezza, ad esempio corrispondendo in dimensione ai prodotti di RNA generati dal clivaggio Dicer-dipendente. In certe realizzazioni il costrutto di shRNA ha una lunghezza di almeno 25, 50, 100, 200, 300 o 400 basi. In certe realizzazioni il costrutto di shRNA ha una lunghezza di 400-800 basi. I costrutti di shRNA sono altamente tolleranti a variazioni nella sequenza delle anse e nelle dimensioni delle anse.

Ai presenti fini il termine "ribozima" indica una molecola di RNA cataliticamente attiva capace di clivaggio specifico per il sito dell'mRNA bersaglio. Sono stati descritti parecchi sottotipi, ad esempio ribozimi a testa di martello e a forcina. È possibile migliorare l'attività catalitica e la stabilità dei ribozimi sostituendo deossiribonucleotidi in luogo di ribonucleotidi in basi non catalitiche. Sebbene si possano usare ribozimi che clivano mRNA in sequenze di

riconoscimento specifiche per un sito per distruggere particolari mRNA, si preferisce l'uso di ribozimi a testa di martello. I ribozimi a testa di martello clivano i mRNA in ubicazioni dettate da regioni di affiancamento che formano coppie di basi complementari con il mRNA bersaglio. L'unico requisito è che il mRNA bersaglio abbia la sequenza di due basi data da 5'-UG-3'. Nel settore sono ben note la costruzione e la produzione di ribozimi a testa di martello.

Un metodo preferito di erogazione di un polinucleotide di interesse che comprenda un siRNA, un miRNA, un shRNA o un ribozima comprende una o più sequenze regolatrici, come ad esempio un pol III costitutivo forte, ad esempio un promotore di snRNA U6 umano, il promotore di snRNA U6 del topo, il promotore di RNA H1 umano e del topo, e il promotore di tRNA-val, o un promotore pol II costitutivo forte, come descritto altrove in questa sede.

I polinucleotidi della presente invenzione, indipendentemente dalla lunghezza della sequenza di codifica stessa, possono essere combinati con altre sequenze di DNA, come promotori e/o potenziatori, regioni non tradotte (UTR), sequenze di Kozak, segnali di poliadenilazione, siti di enzimi di restrizione aggiuntivi, multipli siti di clonazione, siti di entrata

ribosomiale interna (IRES), siti di riconoscimento di ricombinasi (ad esempio siti LoxP, FRT e Att), codoni di terminazione, segnali di terminazione della trascrizione, polinucleotidi codificanti polipeptidi autoclivanti ed etichette di epitopi, come esposto altrove in questa sede o come noto nel settore, per cui la loro lunghezza complessiva potrà variare notevolmente. Si contempla pertanto la possibilità di usare un frammento di polinucleotide pressoché di qualsiasi lunghezza, con la lunghezza totale preferibilmente limitata dalla facilità di preparazione e uso nel protocollo con DNA ricombinante inteso.

Si possono preparare, manipolare e/o esprimere polinucleotidi con l'ausilio di una qualsiasi tra svariate tecniche ben consolidate, note e disponibili nell'arte. Al fine di esprimere un polipeptide desiderato è possibile inserire una sequenza nucleotidica codificante il polipeptide in un appropriato vettore. Gli esempi di vettori sono plasmidi, sequenze a replicazione autonoma ed elementi trasponibili. Gli ulteriori esempi di vettori includono a titolo non limitativo plasmidi, fagemidi, cosmidi, cromosomi artificiali come il cromosoma artificiale del lievito (YAC), il cromosoma artificiale batterico (BAC) o il cromosoma artificiale derivato da P1 (PAC), batteriofagi

come il fago lambda o il fago M13, e virus animali. Gli esempi di categorie di virus animali utili come vettori includono a titolo non limitativo retrovirus (compresi lentivirus), adenovirus, virus adeno-associati, herpesvirus (ad esempio il virus dell'herpes simplex), poxvirus, baculovirus, papillomavirus e papovavirus (ad esempio SV40). Sono esempi di vettori di espressione i vettori pCIneo (da Promega) per l'espressione in cellule di mammifero; e pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ e pLenti6.2/V5-GW/lacZ (da Invitrogen) per il trasferimento genico mediato da lentivirus e l'espressione in cellule di mammifero. In particolari realizzazioni le sequenze di codifica delle proteine chimeriche qui esposte possono essere legate in tali vettori di espressione a scopo di espressione della proteina chimerica in cellule di mammifero.

Gli "elementi di controllo" o "sequenze regolatrici" presenti in un vettore di espressione sono le regioni non tradotte del vettore - origine di replicazione, cassette di selezione, promotori, potenziatori, segnali di avvio della traduzione (sequenza di Shine Dalgarno o sequenza di Kozak), introni, una sequenza di poliadenilazione, regioni non tradotte 5' e 3' - che interagiscono con proteine cellulari ospite per

eseguire la trascrizione e la traduzione. Tali elementi possono variare nella loro forza e specificità. A seconda del sistema vettoriale e dell'ospite utilizzato è possibile usare qualsiasi numero di elementi di trascrizione e traduzione idonei, compresi promotori ubiqui e promotori inducibili.

In particolari realizzazioni un vettore per l'uso nella pratica dell'invenzione, compresi a titolo non limitativo vettori di espressione e vettori virali, includerà sequenze di controllo esogene, endogene o eterologhe come promotori e/o potenziatori. Una sequenza di controllo "endogena" è una sequenza naturalmente collegata a un dato gene nel genoma. Una sequenza di controllo "esogena" è una sequenza posta in giustapposizione con un gene tramite manipolazione genetica (ossia con tecniche di biologia molecolare) in maniera che la trascrizione di quel gene sia diretta dal potenziatore/promotore collegato. Una sequenza di controllo "eterologa" è una sequenza esogena proveniente da una specie diversa da quella della cellula sottoposta a manipolazione genetica.

Il termine "promotore" ai presenti fini indica un sito di riconoscimento di un polinucleotide (DNA o RNA) al quale si lega una RNA polimerasi. Una RNA polimerasi avvia e trascrive polinucleotidi operativamente

collegati al promotore. In particolari realizzazioni i promotori operativi nelle cellule di mammifero comprendono una regione ricca in AT situata all'incirca da 25 a 30 basi a monte del sito in cui la trascrizione viene avviata e/o un'altra sequenza che si trova da 70 a 80 basi a monte dell'avvio della trascrizione, una regione CNCAAT dove N può essere qualsiasi nucleotide. Il termine "potenziatore" indica un segmento di DNA che contiene sequenze che sono in grado di fornire una trascrizione potenziata e che in alcuni casi possono funzionare indipendentemente dal loro orientamento rispetto a un'altra sequenza di controllo. Un potenziatore può funzionare in modo cooperativo o additivo con promotori e/o altri elementi potenziatori. Il termine "promotore/potenziatore" indica un segmento di DNA contenente sequenze in grado di fornire funzioni sia di promotore sia di potenziatore.

L'espressione "operativamente collegato" indica una giustapposizione in cui i componenti descritti sono in una relazione che permette loro di funzionare nella maniera intesa. In una realizzazione il termine indica un collegamento funzionale tra una sequenza di controllo dell'espressione di acidi nucleici (ad esempio un promotore e/o potenziatore) e una seconda sequenza polinucleotidica, ad esempio un polinucleotide di

interesse, dove la sequenza di controllo dell'espressione dirige la trascrizione dell'acido nucleico corrispondente alla seconda sequenza.

Ai presenti fini l'espressione "sequenza di controllo dell'espressione costitutiva" indica un promotore, potenziatore o promotore/potenziatore che permette continuamente o con continuità la trascrizione di una sequenza operativamente collegata. Una sequenza di controllo dell'espressione costitutiva può essere un promotore, potenziatore o promotore/potenziatore "ubiquo" che permetta l'espressione in un'ampia varietà di tipi di cellule e tessuti, oppure un promotore, potenziatore o promotore/potenziatore "specifico per cellula", "specifico per tipo di cellula", "specifico per stirpe di cellula" o "specifico per tessuto" che permetta l'espressione in una varietà ristretta di tipi di cellule e tessuti, rispettivamente.

Le sequenze di controllo dell'espressione ubiqua illustrative che sono idonee per l'uso in particolari realizzazioni dell'invenzione includono a titolo non limitativo un promotore precoce immediato del citomegalovirus (CMV), un virale (ad esempio precoce o tardivo) del virus delle scimmie 40 (SV40), un promotore di LTR del virus della leucemia murina di Moloney (MoMLV), una LTR del virus del sarcoma di Rous (RSV),

un promotore (di timidina chinasi) del virus dell'herpes simplex (HSV), H5, P7.5 e promotori P11 da vaccinia virus, un promotore del fattore di elongazione 1-alfa (EF1 α), risposta della crescita precoce 1 (EGR1), ferritina H (FerH), ferritina L (FerL), gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), fattore 4A1 di avvio della traduzione eucariotica (EIF4A1), proteina 5 da 70 kDa dello shock termico (HSPA5), proteina da 90 kDa dello shock termico beta, membro 1 (HSP90B1), proteina da 70 kDa dello shock termico (HSP70), β -kinesina (β -KIN), il locus 26 di ROSA umano (Irions et al., *Nature Biotechnology* 25:1477-1482 (2007)), un promotore dell'ubiquitina C (UBC), un promotore della fosfoglicerato chinasi-1 (PGK), un potenziatore del citomegalovirus / promotore della β -actina dei polli (CAG), un promotore della β -actina e un promotore potenziatore del virus del sarcoma mieloproliferativo con delezione della regione di controllo negativo e sostituzione del sito di legame all'innesco dl587rev (MND) (Challita et al., *J. Virol.* 69(2):748-55 (1995)).

In una particolare realizzazione potrebbe essere desiderabile esprimere un polinucleotide comprendente un CAR da un promotore che fornisca un'espressione stabile e a lungo termine di CAR in linfociti T e a livelli sufficienti a ridirigere i linfociti T verso

cellule esprimenti l'antigene bersaglio. In una realizzazione preferita il promotore è un promotore MND. In una realizzazione un vettore dell'invenzione comprende un promotore MND comprendente una o più inserzioni, delezioni, sostituzioni o modifiche di nucleotidi che aumentino, riducano o stabilizzino l'attività del promotore MND.

Ai presenti fini per "espressione condizionale" si può intendere qualsiasi tipo di espressione condizionale, comprese a titolo non limitativo: l'espressione inducibile; l'espressione reprimibile; l'espressione in cellule o tessuti aventi un particolare stato fisiologico, biologico o di malattia, e così via. Questa definizione non intende escludere l'espressione specifica per tipo cellulare o per tessuto. Certe realizzazioni dell'invenzione forniscono l'espressione condizionale di un polinucleotide di interesse, ad esempio con espressione controllata sottoponendo una cellula, tessuto, organismo, eccetera a un trattamento o condizione che induca l'espressione del polinucleotide o che causi un aumento o una diminuzione nell'espressione del polipeptide codificato dal polinucleotide di interesse.

Gli esempi illustrativi di promotori/sistemi inducibili includono a titolo non limitativo promotori

inducibili da steroidi come i promotori per geni che codificano recettori di glucocorticoidi o estrogeni (inducibili via trattamento con l'ormone corrispondente), il promotore della metallotioneina (inducibile via trattamento con vari metalli pesanti), il promotore MX-1 (inducibile via interferone), il sistema regolabile con mifepristone "GeneSwitch" (Sirin et al., 2003, *Gene* 323:67), il gene switch inducibile con cumato (WO 2002/088346), sistemi regolatori dipendenti da tetraciclina, eccetera.

È possibile ottenere espressione condizionale anche con l'ausilio di una DNA ricombinasi specifica per sito. In accordo con certe realizzazioni dell'invenzione il vettore comprende almeno uno e tipicamente due siti per la ricombinazione mediata da una ricombinasi specifica per sito. Ai presenti fini i termini "ricombinasi" o "ricombinasi specifica per sito" includono proteine di escissione o integrazione, enzimi, cofattori o proteine associate che siano coinvolti in reazioni di ricombinazione che comportino uno o più siti di ricombinazione (ad esempio due, tre, quattro, cinque, sette, dieci, dodici, quindici, venti, trenta, cinquanta, eccetera), che potranno essere proteine selvatiche (vedi Landy, *Current Opinion in Biotechnology* 3:699-707 (1993)) oppure mutanti,

derivati (ad esempio proteine di fusione contenenti le sequenze di proteine di ricombinazione o relativi frammenti), frammenti e varianti delle stesse. Gli esempi illustrativi di ricombinasi idonee per l'uso in particolari realizzazioni della presente invenzione includono a titolo non limitativo Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin, Φ C31, Cin, Tn3 resolvasi, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCE1 e ParA.

I vettori possono comprendere uno o più siti di ricombinazione per una qualsiasi tra un'ampia varietà di ricombinasi specifiche per sito. Dovrà restare inteso che il sito bersaglio per una ricombinasi specifica per sito è in aggiunta a ogni eventuale o eventuali siti richiesti per l'integrità di un vettore, ad esempio un vettore retrovirale o vettore lentivirale. Ai presenti fini i termini "sequenza di ricombinazione" "sito di ricombinazione" o "sequenza di ricombinazione specifica per sito" indicano una particolare sequenza di acidi nucleici che una ricombinasi riconosce e lega. Ad esempio un sito di ricombinazione per la Cre ricombinasi è loxP, che è una sequenza di 34 coppie di basi comprendente due ripetizioni invertite di 13 coppie di basi (che fungono da siti di legame per la ricombinasi) che affiancano una sequenza centrale di 8 coppie di basi (vedi fig. 1 in B. Sauer, *Current Opinion in*

Biotechnology 5:521-527 (1994)). Altri siti loxP esemplificativi includono a titolo non limitativo lox511 (Hoess et al., 1996; Bethke e Sauer, 1997), lox5171 (Lee e Saito, 1998), lox2272 (Lee e Saito, 1998), m2 (Langer et al., 2002), lox71 (Albert et al., 1995) e lox66 (Albert et al., 1995).

I siti di riconoscimento idonei per la FLP ricombinasi includono a titolo non limitativo FRT (McLeod, et al., 1996), F₁, F₂, F₃ (Schlake e Bode, 1994), F₄, F₅ (Schlake e Bode, 1994), FRT(LE) (Senecoff et al., 1988) e FRT(RE) (Senecoff et al., 1988).

Altri esempi di sequenze di riconoscimento sono le sequenze attB, attP, attL e attR, che sono riconosciute dall'enzima di ricombinasi λ integrasi, ad esempio phi-c31. La SSR di ϕ C31 media la ricombinazione solo tra i siti eterotipici attB (34 coppie di basi in lunghezza) e attP (39 coppie di basi in lunghezza) (Groth et al., 2000); attB e attP, come denominati per i siti di attacco per la fago integrasi sui genomi rispettivamente di batterio e di fago, contengono entrambi ripetizioni invertite imperfette che sono presumibilmente legate da omodimeri di ϕ C31 (Groth et al., 2000). I siti prodotti, attL e attR, sono efficacemente inerti a un'ulteriore ricombinazione mediata da ϕ C31 (Belteki et al., 2003), il che rende la

reazione irreversibile. Per catalizzare inserzioni è stato riscontrato che un DNA portatore di attB si inserisce in un sito attP genomico più facilmente di un sito attP in un sito attB genomico (Thyagarajan et al., 2001; Belteki et al., 2003). Pertanto, le strategie tipiche posizionano per ricombinazione omologa un sito "di attracco" portatore di attP in un locus definito, che viene poi accoppiato con una sequenza in arrivo portatrice di attB a scopo di inserzione.

Ai presenti fini per "sito di entrata interna di ribosomi" o "IRES" si intende un elemento che promuove l'entrata ribosomiale interna diretta nel codone di avvio, come ATG, di un cistrone (una regione codificante proteina), portando di conseguenza alla traduzione del gene indipendente dalla capsula. Si vedano a titolo di esempio Jackson et al., 1990, *Trends Biochem. Sci.* 15(12):477-83; e Jackson e Kaminski, 1995, *RNA* 1(10):985-1000. In particolari realizzazioni i vettori contemplati dall'invenzione includono uno o più polinucleotidi di interesse che codificano uno o più polipeptidi. In particolari realizzazioni per ottenere un efficace traduzione di ciascuno tra la pluralità di polipeptidi le sequenze polinucleotidiche possono essere separate da una o più sequenze IRES o

sequenze polinucleotidiche codificanti polipeptidi autoclivanti.

Ai presenti fini l'espressione "sequenza di Kozak" indica una breve sequenza nucleotidica che agevola di molto il legame iniziale dell'mRNA alla piccola sottounità del ribosoma e aumenta la traduzione. La sequenza di Kozak di consenso è (GCC)RCCATGG (SEQ ID N° 27) dove R è una purina (A o G) (Kozak, 1986, *Cell* 44(2):283-92 e Kozak, 1987, *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48). In particolari realizzazioni i vettori contemplati dall'invenzione comprendono polinucleotidi che presentano una sequenza di Kozak di consenso e che codificano un polipeptide desiderato, ad esempio un CAR.

In alcune realizzazioni dell'invenzione un polinucleotide o cellula che ospita il polinucleotide utilizza un gene del suicidio, compreso un gene del suicidio inducibile, per ridurre il rischio di tossicità diretta e/o proliferazione incontrollata. In specifici aspetti il gene del suicidio non è immunogenico verso l'ospite che accoglie il polinucleotide o la cellula. Un determinato esempio di un gene del suicidio che si può usare è la caspasi-9 o caspasi-8 o citosina deaminasi. La caspasi-9 può essere attivata con l'ausilio di uno specifico induttore chimico di dimerizzazione

(CID).

In certe realizzazioni i vettori comprendono segmenti di gene che inducono le cellule effettrici immunitarie dell'invenzione, ad esempio linfociti T, a essere suscettibili di selezione negativa *in vivo*. Per "selezione negativa" si intende che la cellula infusa può essere eliminata come conseguenza di un cambiamento nella condizione *in vivo* dell'individuo. Il fenotipo selezionabile negativo può derivare dall'inserzione di un gene che conferisca sensibilità a un agente somministrato, ad esempio un composto. Nel settore sono noti geni selezionabili negativi, che includono tra gli altri i seguenti: il gene della timidina chinasi del virus dell'herpes simplex di tipo I (HSV-I TK) (Wigler et al., *Cell* 11:223, 1977), che conferisce sensibilità al ganciclovir; il gene dell'ipossantina fosforibosiltransferasi (HPRT) cellulare, il gene dell'adenina fosforibosiltransferasi (APRT) cellulare, e la citosina deamminasi batterica (Mullen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:33 (1992)).

In alcune realizzazioni le cellule effettrici immunitarie geneticamente modificate, come i linfociti T, comprendono un polinucleotide ulteriormente comprendente un marcatore positivo che permette la selezione

di cellule del fenotipo selezionabile negativo *in vitro*. Il marcatore selezionabile positivo può essere un gene che una volta introdotto nella cellula ospite esprima un fenotipo dominante che permetta la selezione positiva di cellule portatrici del gene. I geni di questo tipo sono noti nel settore e includono tra gli altri il gene dell'igromicina B fosfotransferasi (hph), che conferisce resistenza all'igromicina B, il gene dell'amminoglicoside fosfotransferasi (neo o aph) da Tn5, che codifica per la resistenza all'antibiotico G418, il gene della diidrofolato reduttasi (DHFR), il gene dell'adenosina deamminasi (ADA) e il gene della resistenza multifarmaco (MDR).

Preferibilmente il marcatore selezionabile positivo e l'elemento selezionabile negativo sono collegati in maniera che la perdita dell'elemento selezionabile negativo sia necessariamente accompagnata anche dalla perdita del marcatore selezionabile positivo. Ancora più preferibilmente il marcatore selezionabile positivo e quello negativo sono fusi in modo che la perdita dell'uno conduca inevitabilmente alla perdita dell'altro. Un esempio di un polinucleotide fuso che dà origine come prodotto di espressione a un polipeptide che conferisce entrambi gli attributi desiderati di selezione positiva e negativa sopra descritti è un gene di

fusione di igromicina fosfotransferasi e timidina chinasi (HyTK). L'espressione di tale gene fornisce un polipeptide che conferisce resistenza all'igromicina B per la selezione positiva *in vitro* e sensibilità al ganciclovir per la selezione negativa *in vivo*. Si veda S.D. Lupton et al., *Mol. and Cell. Biology* 11:3374-3378, 1991. In aggiunta, in realizzazioni preferite i polinucleotidi dell'invenzione codificanti i recettori chimerici si trovano in vettori retrovirali contenenti il gene fuso, in particolare quelli che conferiscono resistenza all'igromicina B a scopo di selezione positiva *in vitro* e sensibilità al ganciclovir a scopo di selezione negativa *in vivo*, ad esempio il vettore retrovirale HyTK descritto in S.D. Lupton et al. (1991), sopraccitato. Si vedano anche le pubblicazioni PCT US91/08442 e PCT/US94/05601, di S.D. Lupton, che descrivono l'uso di geni di fusione selezionabili bifunzionali derivati dalla fusione di marcatori selezionabili positivi dominanti con marcatori selezionabili negativi.

I marcatori selezionabili positivi preferiti sono derivati da geni selezionati dal gruppo consistente di hph, nco e gpt, mentre i marcatori selezionabili negativi preferiti sono derivati da geni selezionati dal gruppo consistente di citosina deamminasi, HSV-I TK,

VZV TK, HPRT, APRT e gpt. I marcatori particolarmente preferiti sono geni di fusione selezionabili bifunzionali in cui il marcatore selezionabile positivo è derivato da hph o neo mentre il marcatore selezionabile negativo è derivato da citosina deamminasi o da un gene TK o marcatore selezionabile.

F. Vettori virali

In particolari realizzazioni si trasduce una cellula (ad esempio un linfocita T) con un vettore retrovirale, ad esempio un vettore lentivirale, codificante un CAR. Ad esempio il vettore comprende un promotore MND e codifica un CAR che combina un dominio di legame specifico per antigene di un anticorpo che lega un polipeptide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Muc1, Muc16, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2 con un dominio intracellulare

di segnalazione di CD3 ζ , CD28, 4-1BB, O \times 40, o qualsiasi combinazione di questi. Tali linfociti T trasdotti potranno quindi suscitare una risposta di linfociti T mediata da CAR che sia stabile, a lungo termine e persistente.

I retrovirus sono uno strumento comune per l'erogazione di geni (Miller, 2000, *Nature* 357:455-460). In particolari realizzazioni si usa un retrovirus per erogare un polinucleotide codificante un recettore antigenico chimerico (CAR) a una cellula. Ai presenti fini l'espressione "retrovirus" indica un virus a RNA che trascrive inversamente il proprio RNA genomico in una copia di DNA a doppio filamento lineare e successivamente integra in maniera covalente il proprio DNA genomico in un genoma ospite. Una volta integrato nel genoma ospite, il virus è detto "provirus". Il provirus funge da stampo per la RNA polimerasi II e dirige l'espressione di molecole di RNA che codificano gli enzimi e proteine strutturali necessarie per produrre nuove particelle virali.

I retrovirus illustrativi idonei per l'uso in particolari realizzazioni includono a titolo non limitativo: virus della leucemia murina di Moloney (M-MuLV), virus del sarcoma murino di Moloney (MoMSV), virus del sarcoma murino di Harvey (HaMuSV), virus del tumore

mammario murino (MuMTV), virus della leucemia del gibbono (GaLV), virus della leucemia felina (FLV), spumavirus, virus della leucemia murina di Friend, virus delle cellule staminali murine (MSCV), virus del sarcoma di Rous (RSV) e lentivirus.

Ai presenti fini l'espressione "lentivirus" indica un gruppo (o genere) di retrovirus complessi. I lentivirus illustrativi includono a titolo non limitativo: HIV (virus dell'immunodeficienza umana; compresi HIV di tipo 1 e HIV di tipo 2), virus visna-maedi (VMV), virus dell'artrite-encefalite caprina (CAEV), virus dell'anemia infettiva equina (EIAV), virus dell'immunodeficienza felina (FIV), virus dell'immunodeficienza bovina (BIV) e virus dell'immunodeficienza delle scimmie (SIV). Secondo una realizzazione si preferiscono spine dorsali vettoriali basate su HIV (ad esempio elementi di sequenza di HIV ad azione cis). In particolari realizzazioni si usa un lentivirus per erogare un polinucleotide comprendente un promotore MND e codificante un CAR a una cellula.

Si possono usare vettori retrovirali e più in particolare vettori lentivirali nella pratica di particolari realizzazioni della presente invenzione. Pertanto, i termini "retrovirus" e "vettore retrovirale" ai presenti fini si intendono includere

rispettivamente "lentivirus" e "vettori lentivirali". Il termine "vettore" si usa nella presente per indicare una molecola di acido nucleico in grado di trasferire o trasportare un'altra molecola di acido nucleico. In genere l'acido nucleico trasferito è collegato alla (ad esempio inserito nella) molecola di acido nucleico del vettore. Un vettore può includere sequenze che dirigano la replicazione autonoma in una cellula, o può includere sequenze sufficienti a permettere l'integrazione nel DNA della cellula ospite. I vettori utili includono tra gli altri plasmidi (ad esempio plasmidi di DNA o plasmidi di RNA), trasposoni, cosmidi, cromosomi artificiali batterici e vettori virali. I vettori virali utili includono ad esempio retrovirus difettivi in replicazione e lentivirus.

Come apparirà evidente agli esperti del settore, l'espressione "vettore virale" è usata ampiamente in riferimento a una molecola di acido nucleico (ad esempio un plasmide di trasferimento) comprendente elementi di acido nucleico di derivazione virale che tipicamente facilitano il trasferimento della molecola di acido nucleico o l'integrazione nel genoma di una cellula o in una particella virale che possa mediare il trasferimento dell'acido nucleico. Le particelle virali includeranno tipicamente vari componenti virali

e talvolta anche componenti della cellula ospite oltre all'acido nucleico o acidi nucleici.

L'espressione "vettore virale" può riferirsi a un virus o particella virale in grado di trasferire un acido nucleico in una cellula oppure all'acido nucleico trasferito stesso. I vettori virali e i plasmidi di trasferimento contengono elementi genetici strutturali e/o funzionali derivati principalmente da un virus. L'espressione "vettore retrovirale" si riferisce a un vettore virale o plasmide contenente elementi genetici strutturali e funzionali, o loro porzioni, che siano principalmente derivati da un retrovirus. L'espressione "vettore lentivirale" si riferisce a un vettore virale o plasmide contenente elementi genetici strutturali e funzionali, o loro porzioni, comprese LTR, che siano principalmente derivati da un lentivirus. L'espressione "vettore ibrido" si riferisce a un vettore, LTR o altro acido nucleico contenente sia sequenze retrovirali, ad esempio lentivirali, sia sequenze virali non lentivirali. In una realizzazione per vettore ibrido si intende un vettore o plasmide di trasferimento comprendente sequenze retrovirali, ad esempio lentivirali, a scopo di trascrizione inversa, replicazione, integrazione e/o impacchettamento.

In particolari realizzazioni i termini "vettore

lentivirale" e "vettore di espressione lentivirale" possono essere usati in riferimento a plasmidi di trasferimento lentivirali e/o particelle lentivirali infettive. Ove in questa sede si faccia riferimento a elementi come siti di clonazione, promotori, elementi regolatori, acidi nucleici eterologhi e via dicendo, si dovrà intendere che le sequenze di tali elementi sono presenti in forma di RNA nelle particelle lentivirali dell'invenzione e sono presenti in forma di DNA nei plasmidi di DNA dell'invenzione.

A ciascuna estremità del provirus si trovano strutture dette "ripetizioni terminali lunghe" o "LTR". L'espressione "ripetizione terminale lunga (LTR)" indica domini di coppie di basi situati alle estremità di DNA retrovirali, che nel loro contesto di sequenza naturale sono ripetizioni dirette e contengono regioni U3, R e U5. In genere le LTR forniscono funzioni fondamentali per l'espressione di geni retrovirali (ad esempio promozione, avvio e poliadenilazione di trascritti genici) e per la replicazione virale. Le LTR contengono numerosi segnali regolatori, compresi elementi di controllo della trascrizione, segnali di poliadenilazione e sequenze necessarie per la replicazione e l'integrazione del genoma virale. La LTR virale è suddivisa in tre regioni dette U3, R e U5. La regione

U3 contiene gli elementi potenziatori e promotori. La regione U5 è la sequenza tra il sito di legame all'innesco e la regione R e contiene la sequenza di poliadrenilazione. La regione R (ripetizione) è affiancata dalle regioni U3 e U5. La LTR è composta dalle regioni U3, R e U5 e compare a entrambe le estremità 5' e 3' del genoma virale. In adiacenza alla LTR 5' si trovano sequenze necessarie per la trascrizione inversa del genoma (il sito di legame all'innesco di tRNA) e per un efficace impacchettamento di RNA virale in particelle (il sito psi).

Ai presenti fini l'espressione "segnale di packaging" o "sequenza di packaging" indica sequenze ubicate all'interno del genoma retrovirale necessarie per l'inserzione dell'RNA virale nel capsido o particella virale (vedi ad esempio, Clever et al., 1995, *J. of Virology*, vol. 69, n° 4, pagg. 2101-2109). Parecchi vettori retrovirali usano il segnale di packaging minimo (detto anche sequenza psi [Ψ]) necessario per l'incapsidazione del genoma virale. Pertanto, ai presenti fini, le espressioni "sequenza di packaging", "segnale di packaging" e "psi" e il simbolo " Ψ " si usano per indicare la sequenza non di codifica necessaria per l'incapsidazione di filamenti di RNA retrovirali durante la formazione di particelle virali.

In varie realizzazioni i vettori comprendono LTR 5' e/o LTR 3' modificate. Una o entrambe le LTR possono comprendere una o più modifiche, tra cui a titolo non limitativo una o più delezioni, inserzioni o sostituzioni. Si eseguono spesso modifiche alla LTR 3' per migliorare la sicurezza di sistemi lentivirali o retrovirali rendendo i virus difettivi in replicazione. Ai presenti fini l'espressione "difettivo in replicazione" significa un virus incapace di replicazione completa ed efficiente tale che non si producano virioni inefficaci (ad esempio progenie lentivirale difettiva in replicazione). Il termine "competente in replicazione" indica un virus selvatico o un virus mutante capace di replicazione così che la replicazione virale del virus sia in grado di produrre virioni efficaci (ad esempio progenie lentivirale competente in replicazione).

Per vettori "autoinattivanti" (SIN) si intendono vettori difettivi in replicazione, ad esempio vettori retrovirali o lentivirali, in cui la regione potenziatrice-promotrice LTR destra (3'), nota come regione U3, è stata modificata (ad esempio per delezione o sostituzione) per prevenire la trascrizione virale oltre la prima tornata di replicazione virale; questo perché la regione LTR destra (3') U3 serve da stampo

per la regione LTR sinistra (5') U3 durante la replicazione virale, per cui non è possibile creare il trascritto virale senza la regione U3 potenziatrice-promotrice. In un'ulteriore realizzazione dell'invenzione si modifica la LTR 3' in modo che la regione U5 sia sostituita ad esempio da una sequenza poli(A) ideale. Si dovrà notare che nell'invenzione si includono anche modifiche alle LTR, come modifiche alla LTR 3', alla LTR 5', o ad ambo le LTR 3' e 5'.

Si fornisce un ulteriore miglioramento della sicurezza sostituendo la regione U3 della LTR 5' con un promotore eterologo per spingere la trascrizione del genoma virale nel corso della produzione di particelle virali. Gli esempi di promotori eterologhi che si possono usare includono ad esempio i promotori virali (ad esempio precoce o tardivo) del virus delle scimmie 40 (SV40), del citomegalovirus (CMV) (ad esempio precoce immediato), del virus della leucemia murina di Moloney (MoMLV), del virus del sarcoma di Rous (RSV) e del virus dell'herpes simplex (HSV) (timidina chinasi). I tipici promotori sono in grado di spingere elevati livelli di trascrizione in maniera indipendente dal tat. Questa sostituzione riduce la possibilità di ricombinazione per generare un virus competente in replicazione perché non si ha sequenza U3 completa nel

sistema di produzione del virus. In certe realizzazioni il promotore eterologo ha ulteriori vantaggi nel controllo della maniera in cui si trascrive il genoma virale. Ad esempio il promotore eterologo può essere inducibile, così che la trascrizione di tutto o di parte del genoma virale abbia luogo solo quando sono presenti fattori di induzione. I fattori di induzione includono a titolo non limitativo uno o più composti chimici o condizioni fisiologiche come la temperatura o il pH sotto le quali si coltivano le cellule ospite.

In alcune realizzazioni i vettori virali comprendono un elemento TAR. Il termine "TAR" indica l'elemento genetico di "risposta di trans-attivazione" situato nella regione R delle LTR lentivirali (ad esempio di HIV). Tale elemento interagisce con l'elemento genetico trans-attivatore lentivirale (tat) per potenziare la replicazione virale. Tale elemento non è tuttavia obbligatorio in realizzazioni in cui la regione U3 della LTR 5' sia rimpiazzata da un promotore eterologo.

Per "regione R" si intende la regione all'interno delle LTR retrovirali che comincia all'inizio del gruppo di richiusura (ossia l'avvio della trascrizione) e finisce immediatamente prima dell'inizio del tratto poliA.

La regione R è inoltre definita come affiancata dalle regioni U3 e U5. La regione R gioca un certo ruolo durante la trascrizione inversa nel permettere il trasferimento di DNA nascente da un'estremità del genoma all'altra.

Ai presenti fini l'espressione "elemento FLAP" indica un acido nucleico la cui sequenza include il tratto centrale di polipurina e le sequenze di terminazione centrali (cPPT e CTS) di un retrovirus, ad esempio HIV-1 o HIV-2. Si descrivono elementi FLAP idonei nel Brevetto degli Stati Uniti n° 6,682,907 e in Zennou et al., 2000, *Cell* 101:173. Durante la trascrizione inversa di HIV-1 l'avvio centrale del DNA a filamento positivo nel tratto di polipurina centrale (cPPT) e la terminazione centrale nella sequenza di terminazione centrale (CTS) portano alla formazione di una struttura di DNA a triplo filamento: il lembo di DNA centrale dell'HIV-1. Pur non volendo sottostare ad alcuna teoria, il lembo di DNA può fungere da determinante cis-attivo dell'importazione nucleare di genoma lentivirale e/o può aumentare il titolo del virus. In particolari realizzazioni le spine dorsali dei vettori retrovirali o lentivirali comprendono uno o più elementi FLAP a monte o a valle dei geni eterologhi di interesse nei vettori. Ad esempio in particolari

realizzazioni un plasmide di trasferimento include un elemento FLAP. In una realizzazione un vettore dell'invenzione comprende un elemento FLAP isolato da HIV-1.

In una realizzazione i vettori di trasferimento retrovirali o lentivirali comprendono uno o più elementi di esportazione. L'espressione "elemento di esportazione" designa un elemento regolatore post-trascrizionale ad azione cis che regola il trasporto di un trascritto di RNA dal nucleo al citoplasma di una cellula. Gli esempi di elementi di esportazione di RNA includono a titolo non limitativo l'elemento di risposta rev (RRE) del virus dell'immunodeficienza umana (HIV) (vedi ad esempio Cullen et al., 1991, *J. Virol.* 65:1053; e Cullen et al., 1991, *Cell* 58:423) e l'elemento regolatore post-trascrizionale del virus dell'epatite B (HPRE). In genere l'elemento di esportazione dell'RNA è situato all'interno della UTR 3' di un gene e può essere inserito come una o come multiple copie.

In particolari realizzazioni si aumenta l'espressione di sequenze eterologhe in vettori virali tramite l'incorporazione di elementi regolatori post-trascrizionali, siti di poliadenilazione efficiente, e facoltativamente segnali di terminazione della trascrizione nei vettori. Svvariati elementi regolatori post-

trascrizionali possono aumentare l'espressione di un acido nucleico eterologo nella proteina, ad esempio l'elemento regolatore post-trascrizionale del virus dell'epatite della marmotta americana (WPRE; Zufferey et al., 1999, *J. Virol.* 73:2886), l'elemento regolatore post-trascrizionale presente nel virus dell'epatite B (HPRE) (Huang et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:3864); e simili (Liu et al., 1995, *Genes Dev.* 9:1766). In particolari realizzazioni i vettori dell'invenzione comprendono un elemento regolatore post-trascrizionale come WPRE o HPRE.

In particolari realizzazioni i vettori dell'invenzione sono privi o non comprendono un elemento regolatore post-trascrizionale come un WPRE o HPRE perché in alcune istanze tali elementi alzano il rischio di trasformazione cellulare e/o non aumentano sostanzialmente o significativamente la quantità di trascritto di mRNA né aumentano la stabilità dell'mRNA. In alcune realizzazioni pertanto i vettori dell'invenzione sono privi o non comprendono un WPRE o HPRE come misura di sicurezza aggiunta.

Gli elementi che dirigono l'efficiente terminazione e poliadenilazione dei trascritti eterologhi di acido nucleico incrementano l'espressione genica eterologa. I segnali di terminazione della trascrizione sono

generalmente situati a valle del segnale di poliadenilazione. In particolari realizzazioni i vettori comprendono una sequenza di poliadenilazione al 3' di un polinucleotide che codifica un polipeptide da esprimere. L'espressione "sito poliA" o "sequenza poliA" ai presenti fini denota una sequenza di DNA che dirige sia la terminazione sia la poliadenilazione del trascritto di RNA nascente tramite RNA polimerasi II. Le sequenze di poliadenilazione possono promuovere la stabilità dell'mRNA mediante aggiunta di una coda poliA all'estremità 3' della sequenza di codifica e in tal modo contribuire a una maggiore efficienza traduzionale. È desiderabile un'efficiente poliadenilazione del trascritto ricombinante, dato che i trascritti privi di coda poliA sono instabili e degradano in fretta. Gli esempi illustrativi di segnali poliA che possono essere usati in un vettore dell'invenzione includono una sequenza poliA ideale (ad esempio AATAAA, ATTAAA, AGTAAA), una sequenza poliA dell'ormone della crescita dei bovini (BGHpA), una sequenza poliA di β -globina di coniglio (r β gpA), e altre idonee sequenze poliA eterologhe o endogene note nel settore.

In certe realizzazioni un vettore retrovirale o lentivirale comprende ulteriormente uno o più elementi isolatori. Gli elementi isolatori possono contribuire

a proteggere sequenze esprimenti un lentivirus, ad esempio polipeptidi terapeutici, da effetti collaterali di integrazione, che potrebbero essere mediati da elementi ad azione cis presenti nel DNA genomico causando un'espressione deregolata delle sequenze trasferite (ossia un effetto di posizione; si vedano ad esempio Burgess-Beusse et al., 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:16433; e Zhan et al., 2001, *Hum. Genet.* 109:471). In alcune realizzazioni i vettori di trasferimento comprendono uno o più elementi isolatori nella LTR 3', e una volta integrato il provirus nel genoma ospite il provirus comprende gli uno o più isolatori sia alla LTR 5' sia alla LTR 3' in virtù della duplicazione della LTR 3'. Gli isolatori idonei per l'uso nell'invenzione includono a titolo non limitativo l'isolatore della β -globina dei polli (vedi Chung et al. 1993, *Cell* 74:505; Chung et al., 1997, *PNAS* 94:575; e Bell et al., 1999, *Cell* 98:387, incorporati per riferimento nella presente). Gli esempi di elementi isolatori includono a titolo non limitativo un isolatore da un locus di β -globina, come HS4 dei polli.

In accordo con certe specifiche realizzazioni dell'invenzione la maggior parte o tutte le sequenze della spina dorsale del vettore virale sono derivate da un lentivirus, ad esempio HIV-1. Dovrà tuttavia restare

inteso che si possono usare o combinare parecchie fonti diverse di sequenze retrovirali e/o lentivirali, e che possono trovare posto numerose sostituzioni e alterazioni in alcune delle sequenze lentivirali senza menomare la capacità di un vettore di trasferimento di svolgere le funzioni qui descritte. Per di più, nel settore sono noti svariati vettori lentivirali (si vedano Naldini et al., 1996a, 1996b e 1998; Zufferey et al., 1997; Dull et al., 1998; e i Brevetti degli Stati Uniti n° 6,013,516 e 5,994,136), molti dei quali possono essere adattati per produrre un vettore virale o plasmide di trasferimento della presente invenzione. In varie realizzazioni i vettori dell'invenzione comprendono un promotore operativamente collegato a un polinucleotide che codifica un polipeptide CAR. I vettori possono avere una o più LTR, ciascuna LTR comprendendo una o più modifiche, come una o più sostituzioni, aggiunte o delezioni di nucleotidi. I vettori possono ulteriormente comprendere uno o più elementi accessori per aumentare l'efficienza di trasduzione (ad esempio un cPPT/FLAP) o l'impacchettamento virale (ad esempio un segnale di packaging ψ (Ψ), RRE) e/o altri elementi che aumentino l'espressione di geni terapeutici (ad esempio sequenze poli(A)) e facoltativamente possono comprendere un WPRE o HPRE.

In una particolare realizzazione il vettore di trasferimento dell'invenzione comprende una LTR retrovirale sinistra (5'); un tratto di polipurina centrale / lembo di DNA (cPPT/FLAP); un elemento di esportazione retrovirale; un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide che codifica un polipeptide CAR qui contemplato; e una LTR retrovirale destra (3'); e facoltativamente un WPRE o HPRE.

In una particolare realizzazione il vettore di trasferimento dell'invenzione comprende una LTR retrovirale sinistra (5'); un elemento di esportazione retrovirale; un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide che codifica un polipeptide CAR qui contemplato; una LTR retrovirale destra (3'); e una sequenza poli(A); e facoltativamente un WPRE o HPRE.

In un'altra particolare realizzazione l'invenzione fornisce un vettore lentivirale comprendente una LTR sinistra (5'); un cPPT/FLAP; un RRE; un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide che codifica un polipeptide CAR qui contemplato; una LTR destra (3'); e una sequenza di poliadenilazione; e facoltativamente un WPRE o HPRE.

In una certa realizzazione l'invenzione fornisce un vettore lentivirale comprendente una LTR sinistra (5')

di HIV-1; un segnale di packaging psi (Ψ); un cPPT/FLAP; un RRE; un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide che codifica un polipeptide CAR qui contemplato; una LTR destra (3') autoinattivante (SIN) di HIV-1; e una sequenza di poliadenilazione di β -globina di coniglio; e facoltativamente un WPRE o HPRE.

In un'altra realizzazione l'invenzione fornisce un vettore comprendente: almeno una LTR; un tratto di polipurina centrale / lembo di DNA (cPPT/FLAP); un elemento di esportazione retrovirale; e un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide che codifica un polipeptide CAR qui contemplato; e facoltativamente un WPRE o HPRE.

In una particolare realizzazione la presente invenzione fornisce un vettore comprendente: almeno una LTR; un cPPT/FLAP; un RRE; un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide che codifica un polipeptide CAR qui contemplato; e una sequenza di poliadenilazione; e facoltativamente un WPRE o HPRE.

In una certa realizzazione la presente invenzione fornisce almeno una LTR SIN di HIV-1; un segnale di packaging psi (Ψ); un cPPT/FLAP; un RRE; un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide che codifica un polipeptide CAR qui contemplato; e una

sequenza di poliadenilazione di β -globina di coniglio; e facoltativamente un WPRE o HPRE.

Gli esperti del settore apprezzeranno che parecchie altre realizzazioni differenti possono essere modellate a partire dalle realizzazioni esistenti dell'invenzione.

Una "cellula ospite" include cellule trasfettate, infettate o trasdotte *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* con un vettore ricombinante o un polinucleotide dell'invenzione. Le cellule ospiti possono includere cellule di packaging, cellule produttrici e cellule infettate con vettori virali. In particolari realizzazioni le cellule ospiti infettate con un vettore virale dell'invenzione vengono somministrate a un soggetto bisognoso di terapia. In certe realizzazioni l'espressione "cellula bersaglio" è usata in senso intercambiabile con "cellula ospite" in riferimento a cellule trasfettate, infettate o trasdotte di un tipo cellulare desiderato. In realizzazioni preferite la cellula bersaglio è un linfocita T.

Sovente è necessaria la produzione di particelle virali su grande scala per raggiungere un titolo virale ragionevole. Si producono particelle virali trasferendo un vettore di trasferimento in una linea cellulare di packaging comprendente geni virali strutturali

e/o accessori, come geni gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx o nef o altri geni retrovirali.

Ai presenti fini l'espressione "vettore di packaging" indica un vettore di espressione o vettore virale privo di segnale di packaging e comprendente un polinucleotide che codifica uno, due, tre, quattro o più geni virali strutturali e/o accessori. Tipicamente i vettori di packaging sono inclusi in una cellula di packaging e vengono introdotti nella cellula via trasfezione, trasduzione o infezione. Agli esperti del settore sono ben noti metodi per la trasfezione, trasduzione o infezione. Un vettore di trasferimento retrovirale/lentivirale della presente invenzione può essere introdotto in una linea cellulare di packaging via trasfezione, trasduzione o infezione per generare una cellula o linea cellulare produttrice. I vettori di packaging della presente invenzione possono essere introdotti in cellule o linee cellulari umane tramite metodi standard, tra cui ad esempio trasfezione con fosfato di calcio, lipofezione o elettroporazione. In alcune realizzazioni i vettori di packaging vengono introdotti nelle cellule insieme con un marcatore selezionabile dominante, come neomicina, igromicina, puromicina, blastocidina, zeocina, timidina chinasi, DHFR, Gln sintetasi o ADA, con successiva selezione in

presenza dell'appropriato farmaco e isolamento di cloni. Un gene marcatore selezionabile può essere collegato fisicamente a geni codificati tramite il vettore di packaging, ad esempio tramite IRES o peptidi virali autoclivanti.

Le proteine virali dell'involucro (env) determinano la gamma di cellule ospite che alla fine potranno essere infettate e trasformate da retrovirus ricombinanti generati a partire da linee cellulari. Nel caso dei lentivirus come HIV-1, HIV-2, SIV, FIV e EIV le proteine env includono gp41 e gp120. Di preferenza le proteine virali env espresse dalle cellule di packaging dell'invenzione sono codificate su un vettore separato dai geni virali gag e pol come già descritto in precedenza.

Gli esempi illustrativi di geni env di derivazione retrovirale che si possono utilizzare nell'invenzione includono a titolo non limitativo: involucri MLV, involucro 10A1, BAEV, FeLV-B, RD114, SSAV, Ebola, Sendai, FPV (virus della peste aviaria) e involucri di virus dell'influenza. Analogamente si possono utilizzare geni codificanti involucri da virus a RNA (ad esempio virus a RNA dalle famiglie Picornaviridae, Calciviridae, Astroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae,

Filoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Retroviridae) e inoltre virus a DNA (famiglie Hepadnaviridae, Circoviridae, Parvoviridae, Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Poxviridae e Iridoviridae). Gli esempi rappresentativi includono FeLV, VEE, HFVW, WDSV, SFV, rabbia, ALV, BIV, BLV, EBV, CAEV, SNV, ChTLV, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CT10 e EIAV.

In altre realizzazioni le proteine dell'involucro per la pseudotipizzazione di un virus della presente invenzione includono a titolo non limitativo uno qualsiasi dei virus seguenti: virus dell'influenza A come H1N1, H1N2, H3N2 e H5N1 (influenza aviaria), influenza B e influenza C, virus dell'epatite A, virus dell'epatite B, virus dell'epatite C, virus dell'epatite D, virus dell'epatite E, rotavirus, qualsiasi virus del gruppo virale Norwalk, adenovirus enterico, parvovirus, virus della febbre dengue, vaiolo delle scimmie, mononegavirali, lyssavirus come il virus della rabbia, virus dei pipistrelli di Lagos, virus di Mokola, virus di Duvenhage, virus dei pipistrelli europei 1 e 2 e virus dei pipistrelli australiani, ephemerovirus, vesiculovirus, virus della stomatite vescicolare (VSV), herpesvirus come il virus dell'herpes simplex tipi 1 e 2, varicella zoster, citomegalovirus, virus di Epstein-

Barr (EBV), erpesvirus umani (HHV), herpes virus umano tipo 6 e 8, virus dell'immunodeficienza umana (HIV), virus del papilloma, gammaherpesvirus murino, arenavirus come il virus della febbre emorragica dell'Argentina, virus della febbre emorragica della Bolivia, virus della febbre emorragica Sabia-associato, virus della febbre emorragica del Venezuela, virus della febbre di Lassa, virus di Machupo, virus della coriomeningite linfocitica (LCMV), Bunyaviridae come il virus della febbre emorragica della Crimea-Congo, hantavirus, il virus che causa febbre emorragica con sindrome renale, virus della febbre della Rift Valley, Filoviridae (filovirus) tra cui la febbre emorragica Ebola e la febbre emorragica di Marburg, Flaviviridae tra cui il virus del morbo della foresta di Kaysanur, virus della febbre emorragica di Omsk, il virus che causa l'encefalite trasmessa dalle zecche e Paramyxoviridae come il virus di Hendra e il virus di Nipah, variola major e variola minor (vaiolo), alfavirus come il virus dell'encefalite equina del Venezuela, virus dell'encefalite equina orientale, virus dell'encefalite equina occidentale, coronavirus associato a SARS (SARS-CoV), virus del Nilo occidentale, e qualsiasi virus che causi encefalite.

In una realizzazione l'invenzione fornisce cellule di

packaging che producono retrovirus ricombinanti, ad esempio il lentivirus, pseudotipizzati con la glicoproteina VSV-G.

I termini "pseudotipizzare" o "pseudotipizzazione" ai presenti fini indicano un virus le cui proteine virali dell'involucro sono state sostituite con quelle di un altro virus che possiede caratteristiche preferibili. Ad esempio l'HIV può essere pseudotipizzato con proteine dell'involucro come la proteina G del virus della stomatite vescicolare (VSV-G), che permettono all'HIV di infettare una gamma più ampia di cellule, dato che le proteine dell'involucro di HIV (codificate dal gene env) puntano normalmente il virus contro cellule che presentano CD4+. In una realizzazione preferita dell'invenzione si pseudotipizzano proteine lentivirali dell'involucro con VSV-G. In una realizzazione l'invenzione fornisce cellule di packaging che producono retrovirus ricombinante, ad esempio lentivirus, pseudotipizzato con la glicoproteina dell'involucro VSV-G.

Ai presenti fini l'espressione "linee cellulari di packaging" si usa in riferimento a linee cellulari che non contengono un segnale di packaging ma comunque esprimono in maniera stabile o transiente proteine strutturali virali ed enzimi di replicazione (ad

esempio gag, pol e env) che sono necessari per il corretto impacchettamento di particelle virali. Si può utilizzare qualsiasi linea cellulare idonea per preparare cellule di packaging dell'invenzione. In generale le cellule sono cellule di mammifero. In una particolare realizzazione le cellule usate per produrre la linea cellulare di packaging sono cellule umane. Le linee cellulari idonee che possono essere usate includono ad esempio cellule CHO, cellule BHK, cellule MDCK, cellule C3H 10T1/2, cellule FLY, cellule Psi-2, cellule BOSC 23, cellule PA317, cellule WEHI, cellule COS, cellule BSC1, cellule BSC40, cellule BMT10, cellule VERO, cellule W138, cellule MRC5, cellule A549, cellule HT1080, cellule 293, cellule 293T, cellule B-50, cellule 3T3, cellule NIH3T3, cellule HepG2, cellule Saos-2, cellule Huh7, cellule HeLa, cellule W163, cellule 211 e cellule 211A. In realizzazioni preferite le cellule di packaging sono cellule 293, cellule 293T o cellule A549. In un'altra realizzazione preferita le cellule sono cellule A549.

Ai presenti fini l'espressione "linea cellulare produttrice" indica una linea cellulare in grado di produrre particelle retrovirali ricombinanti, comprendenti una linea cellulare di packaging e un costrutto con vettore di trasferimento comprendente un segnale

di packaging. La produzione di particelle virali infettive e di soluzioni virali madre può essere eseguita per mezzo di tecniche convenzionali. Nel settore sono noti metodi per preparare soluzioni virali madre, che si illustrano ad esempio in Y. Soneoka et al. (1995), *Nucl. Acids Res.* 23:628-633, e N.R. Landau et al. (1992), *J. Virol.* 66:5110-5113. Si possono raccogliere particelle virali infettive dalle cellule di packaging con l'ausilio di tecniche convenzionali. Ad esempio si possono raccogliere particelle infettive per lisi cellulare o per raccolta del surnatante della coltura cellulare, come noto nel settore. Facoltativamente le particelle virali raccolte possono essere purificate, se desiderato. Agli esperti del settore sono ben note tecniche di purificazione idonee.

L'erogazione di uno o più geni o di altre sequenze polinucleotidiche con l'ausilio di un vettore retrovirale o lentivirale tramite infezione virale piuttosto che trasfezione è detta "trasduzione". In una realizzazione si trasducono vettori retrovirali in una cellula tramite infezione e integrazione di provirus. In certe realizzazioni una cellula bersaglio, ad esempio un linfocita T, è "trasdotta" se comprende un gene o altra sequenza polinucleotidica erogata alla cellula mediante infezione con l'ausilio di un vettore virale

o retrovirale. In particolari realizzazioni una cellula trasdotta comprende uno o più geni o altre sequenze polinucleotidiche erogate tramite un vettore retrovirale o lentivirale nel suo genoma cellulare.

In particolari realizzazioni le cellule ospite trasdotte con un vettore virale dell'invenzione che esprimono uno o più polipeptidi vengono somministrate a un soggetto per trattare e/o prevenire una malignità ai linfociti B. Per altri metodi legati all'uso di vettori virali in terapia genica che possono essere utilizzati secondo certe realizzazioni della presente invenzione si rimanda ad esempio a M.A. Kay (1997), *Chest* 111(6 supp.):138S-142S; N. Ferry e J.M. Heard (1998), *Hum. Gene Ther.* 9:1975-81; Y. Shiratory et al. (1999), *Liver* 19:265-74; K. Oka et al. (2000), *Curr. Opin. Lipidol.* 11:179-86; P.M. Thule e J.M. Liu (2000), *Gene Ther.* 7:1744-52; N.S. Yang (1992), *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:335-56; M. Alt (1995), *J. Hepatol.* 23:746-58; S.L. Brody e R.G. Crystal (1994), *Ann. NY. Acad. Sci.* 716:90-101; D.S. Strayer (1999), *Expert Opin. Investig. Drugs* 8:2159-2172; J.R. Smith-Arica e J.S. Bartlett (2001), *Curr. Cardiol. Rep.* 3:43-49; e H.C. Lee et al. (2000), *Nature* 408:483-8.

G. Cellule geneticamente modificate

La presente invenzione contempla in particolari

realizzazioni cellule geneticamente modificate per esprimere i CAR qui contemplati per l'uso nel trattamento di casi di cancro. Ai presenti fini l'espressione "sottoposto a ingegneria genetica" o "geneticamente modificato" indica l'aggiunta di materiale genetico extra in forma di DNA o RNA nel materiale genetico totale in una cellula. Le espressioni "cellule geneticamente modificate", "cellule modificate" e "cellule ridirette" si usano in senso intercambiabile. Ai fini della presente l'espressione "terapia genica" significa l'introduzione di materiale genetico aggiuntivo in forma di DNA o RNA nel materiale genetico totale in una cellula in modo da ripristinare, correggere o modificare l'espressione di un gene, o a scopo di espressione di un polipeptide terapeutico, ad esempio un CAR.

In particolari realizzazioni vettori comprendenti un promotore MND e codificanti CAR contemplati in questa sede si introducono e si esprimono in cellule effettrici immunitarie in maniera tale da ridirigere la loro specificità verso un antigene bersaglio di interesse. Una "cellula effettrice immunitaria" è qualsiasi cellula del sistema immunitario che svolga una o più funzioni effettrici (ad esempio attività di uccisione di cellule citotossiche, secrezione di

citochine, induzione di ADCC e/o CDC).

Le cellule effettrici immunitarie dell'invenzione possono essere autologhe/autogeniche ("auto") oppure non autologhe ("non-auto", ad esempio allogeniche, singeniche o xenogeniche).

Per "autologo" ai presenti fini si intendono cellule dallo stesso soggetto.

Per "allogenico" ai presenti fini si intendono cellule della stessa specie che differiscono geneticamente dalla cellula di confronto.

Per "singenico" ai presenti fini si intendono cellule di un soggetto differente che sono geneticamente identiche alla cellula di confronto.

Per "xenogenico" ai presenti fini si intendono cellule di una specie diversa da quella della cellula di confronto. In realizzazioni preferite le cellule dell'invenzione sono allogeniche.

Le cellule effettrici immunitarie illustrative usate con vettori comprendenti i CAR qui contemplati includono linfociti T. Le espressioni "cellula T" e "linfocita T" sono riconosciute nel settore e intendono includere timociti, linfociti T immaturi, linfociti T maturi, linfociti T a riposo, e linfociti T attivati. Un linfocita T può essere un linfocita T helper (Th), ad esempio un linfocita T 1 (Th1) o un linfocita T

helper 2 (Th2). Il linfocita T può essere un linfocita T helper o linfocita T CD4⁺ (HTL; linfocita T CD4⁺), un linfocita T citotossico (CTL; linfocita T CD8⁺), un linfocita T CD4⁺CD8⁺, un linfocita T CD4⁻CD8⁻, o qualsiasi altro sottoinsieme di linfociti T. Altre popolazioni illustrative di linfociti T idonei per l'uso in particolare realizzazioni includono linfociti T nativi e linfociti T della memoria.

Come le persone competenti riconosceranno, si possono introdurre vettori comprendenti un promotore MND e codificanti un CAR in altre cellule che possano essere usate anche come cellule effettrici immunitarie. In particolare le cellule effettrici immunitarie includono anche cellule NK, cellule NKT, neutrofili e macrofagi. Le cellule effettrici immunitarie includono inoltre progenitori di cellule effettrici, tali cellule progenitrici potendo essere indotte a differenziarsi in cellule effettrici immunitarie *in vivo* o *in vitro*. Pertanto, in particolari realizzazioni le cellule effettrici immunitarie includono progenitori di cellule effettrici immunitarie come cellule staminali ematopoietiche (HSC) contenute all'interno della popolazione CD34⁺ di cellule derivate da sangue di cordone, midollo osseo o sangue periferico mobilizzato che una volta somministrate a un soggetto si

differenziano in cellule effettrici immunitarie mature o che possono essere indotte *in vitro* a differenziarsi in cellule effettrici immunitarie mature.

Ai presenti fini le cellule effettrici immunitarie sottoposte a ingegneria genetica per contenere un vettore comprendente un promotore MND e codificante un CAR specifico per antigene possono essere dette "cellule effettrici immunitarie ridirette specifiche per un antigene".

L'espressione "cellula CD34+" ai presenti fini indica una cellula esprime la proteina CD34 sulla propria superficie cellulare. Per "CD34" ai presenti fini si intende una glicoproteina della superficie cellulare (ad esempio una proteina di sialomucina) che spesso funge da fattore di adesione cellula-cellula e che è coinvolta nell'entrata dei linfociti T in linfonodi. La popolazione cellulare CD34⁺ contiene cellule staminali ematopoietiche (HSC), che una volta somministrate a un paziente si differenziano e contribuiscono a tutte le stirpi ematopoietiche, compresi linfociti T, cellule NK, cellule NKT, neutrofili e cellule della stirpe dei monociti/macrofagi.

La presente invenzione fornisce metodi per creare le cellule effettrici immunitarie che esprimono il CAR qui contemplato. In una realizzazione il metodo

comprende la trasfezione o la trasduzione di cellule effettrici immunitarie isolate da un individuo in modo che le cellule effettrici immunitarie esprimano uno o più CAR come descritto in questa sede. In certe realizzazioni le cellule effettrici immunitarie vengono isolate da un individuo e geneticamente modificate senza ulteriore manipolazione *in vitro*. Tali cellule possono poi essere direttamente ri-somministrate nell'individuo. In ulteriori realizzazioni le cellule effettrici immunitarie vengono innanzitutto attivate e stimolate a proliferare *in vitro* prima di essere geneticamente modificate per esprimere un CAR. A tale proposito le cellule effettrici immunitarie possono essere coltivate prima e/o dopo essere state geneticamente modificate (ossia trasdotte o trasfettate per esprimere un CAR qui contemplato).

In particolari realizzazioni, prima della manipolazione *in vitro* o della modifica genetica delle cellule effettrici immunitarie qui descritte si ottiene la fonte di cellule da un soggetto. In particolari realizzazioni le cellule effettrici immunitarie modificate con CAR comprendono linfociti T. I linfociti T possono essere ottenuti da numerose fonti, tra cui a titolo non limitativo cellule mononucleate da sangue periferico, midollo osseo, tessuto di linfonodi,

sangue di cordone, tessuto di timo, tessuto da un sito di infezione, asciti, effusione pleurica, tessuto di milza e tumori. In certe realizzazioni i linfociti T possono essere ottenuti da un'unità di sangue prelevata da un soggetto con l'ausilio di un qualsiasi numero di tecniche note alle persone competenti, come la sedimentazione, ad esempio per separazione con FICOLL™.

In una realizzazione si ottengono per aferesi cellule da sangue in circolo di un individuo. Il prodotto dell'aferesi contiene tipicamente linfociti, compresi linfociti T, monociti, granulociti, linfociti B, altri globuli bianchi nucleati, globuli rossi e piastrine. In una realizzazione le cellule raccolte per aferesi possono essere lavate per rimuovere la frazione di plasma e per porre le cellule in un tampone o mezzo appropriato a scopo di successiva elaborazione. Le cellule possono essere lavate con PBS o con altra soluzione idonea che sia priva di calcio, di magnesio e di gran parte se non tutti i cationi divalenti. Come gli operatori di comune competenza nel settore apprezzeranno, è possibile effettuare una fase di lavaggio tramite metodi noti agli esperti del settore, ad esempio con l'ausilio di una centrifuga semiautomatizzata a flusso passante, ad esempio un

processore cellulare Cobe 2991, un Baxter CytoMate o simili. Dopo il lavaggio le cellule possono essere risospese in svariati tamponi biocompatibili o altra soluzione salina con o senza tampone. In certe realizzazioni si possono rimuovere i componenti indesiderabili del campione di aferesi e risospendere direttamente la cellula in mezzo di coltura.

In certe realizzazioni si isolano linfociti T da cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC) lisando i globuli rossi ed esaurendo i monociti, ad esempio per centrifugazione attraverso un gradiente di PERCOLL™. È possibile isolare ulteriormente mediante tecniche di selezione positiva o negativa una specifica sottopopolazione di linfociti T esprimenti uno o più dei seguenti marcatori: CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA e CD45RO. In una realizzazione si isola ulteriormente mediante tecniche di selezione positiva o negativa una specifica sottopopolazione di linfociti T esprimenti CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA e CD45RO. Ad esempio si può ottenere l'arricchimento di una popolazione di linfociti T tramite selezione negativa con una combinazione di anticorpi diretti verso marcatori di superficie che siano unici per le cellule selezionate negativamente. Un metodo che trova uso in questa sede è l'ordinamento e/o selezione cellulare via immuno-

aderenza magnetica negativa o citometria a flusso che usa un cocktail di anticorpi monoclonali diretti verso marcatori della superficie cellulare presenti sulle cellule negativamente selezionate. Ad esempio a scopo di arricchimento per cellule CD4⁺ tramite selezione negativa, un cocktail di anticorpo monoclonale include tipicamente anticorpi per CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR e CD8. Si possono inoltre usare citometria a flusso e ordinamento cellulare per isolare popolazioni cellulari di interesse per l'uso nella presente invenzione.

Le PBMC possono essere geneticamente modificate direttamente con vettori comprendenti un promotore MND operativamente collegato per esprimere un polinucleotide codificante un CAR qui contemplato. In certe realizzazioni, dopo l'isolamento delle PBMC si isolano ulteriormente linfociti T, e in certe realizzazioni si possono suddividere linfociti T sia citotossici sia helper in sottopopolazioni di linfociti T nativi, della memoria ed effettori, prima o dopo la modifica genetica e/o l'espansione.

Si possono ottenere cellule CD8⁺ con l'ausilio di metodi standard. In alcune realizzazioni le cellule CD8⁺ vengono ulteriormente suddivise in cellule native, di memoria centrale ed effettrici identificando antigeni

della superficie cellulare associati con ciascuno di tali tipi di cellule CD8⁺.

In certe realizzazioni i linfociti T CD8⁺ nativi vengono caratterizzati tramite espressione di marcatori fenotipici di linfociti T nativi, tra cui CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 e CD45RA.

In particolari realizzazioni i linfociti T della memoria sono presenti in sottoinsiemi sia CD62L⁺ sia CD62L⁻ di linfociti del sangue periferico CD8⁺. Si suddividono le PBMC in frazioni CD62L⁻CD8⁺ e CD62L⁺CD8⁺ dopo la colorazione con anticorpi anti-CD8 e anti-CD62L. In alcune realizzazioni l'espressione di marcatori fenotipici di linfociti T della memoria include CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 e CD127, che sono negativi al granzima B. In alcune realizzazioni i linfociti T della memoria centrale sono linfociti T CD45RO⁺, CD62L⁺, CD8⁺.

In alcune realizzazioni i linfociti T effettori sono negativi per CD62L, CCR7, CD28 e CD127 e positivi per granzima B e perforina.

In certe realizzazioni si suddividono ulteriormente i linfociti T CD4⁺ in sottopopolazioni. Ad esempio si possono suddividere linfociti T helper CD4⁺ in cellule native, di memoria centrale ed effettrici via identificazione di popolazioni cellulari che possiedono

antigeni sulla superficie cellulare. Si possono ottenere linfociti CD4⁺ tramite metodi standard. In alcune realizzazioni i linfociti T CD4⁺ nativi sono linfociti T CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD4⁺. In alcune realizzazioni le cellule CD4⁺ della memoria centrale sono positive a CD62L positive e a CD45RO. In alcune realizzazioni le cellule effettrici CD4⁺ sono negative a CD62L e CD45RO.

Le cellule effettrici immunitarie, come i linfociti T, possono essere geneticamente modificate in seguito all'isolamento con l'ausilio di metodi noti, oppure le cellule effettrici immunitarie possono essere attivate ed espanse (o differenziate nel caso delle progenitrici) *in vitro* prima di essere geneticamente modificate. In una particolare realizzazione le cellule effettrici immunitarie, come i linfociti T, vengono geneticamente modificate con i recettori antigenici chimerici qui contemplati (ad esempio trasdotte con un vettore virale comprendente un promotore MND e un acido nucleico codificante un CAR), indi attivate ed espanse *in vitro*. In varie realizzazioni si possono attivare ed espandere linfociti T prima o dopo la modifica genetica per esprimere un CAR, con l'ausilio di metodi come descritti ad esempio nei Brevetti degli Stati Uniti n° 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 e 6,867,041 e nella Pubblicazione di Domanda di Brevetto degli Stati Uniti n° 20060121005.

In generale si espandono i linfociti T tramite contatto con una superficie alla quale è attaccato un agente che simula un segnale associato a un complesso CD3 TCR e un ligando che stimola una molecola co-stimolatrice sulla superficie dei linfociti T. Si possono stimolare popolazioni di linfociti T tramite contatto con un anticorpo anti-CD3 o relativo frammento di legame all'antigene, o con un anticorpo anti-CD2 immobilizzato su una superficie, oppure per contatto con un attivatore della proteina chinasi C (ad esempio briostatina) in unione con uno ionoforo del calcio. Si contempla anche la co-stimolazione di molecole accessorie sulla superficie di linfociti T.

In particolari realizzazioni si pongono PBMC o linfociti T isolati a contatto con un agente stimolatore e con un agente co-stimolatore, come anticorpi anti-CD3 e anti-CD28, generalmente unito a una perla o altra superficie, in mezzo di coltura con appropriate citochine, come IL-2, IL-7 e/o IL-15. Per stimolare la proliferazione di linfociti T CD4⁺ T o linfociti T CD8⁺ si possono usare un anticorpo anti-CD3 e un anticorpo

anti-CD28, gli esempi di anticorpi anti-CD28 comprendendo 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacione, Besançon, Francia), così come altri metodi comunemente noti nel settore (Berg et al., *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., *J. Exp. Med.* 190(9):1319-1328, 1999; Garland et al., *J. Immunol. Meth.* 227(1-2):53-63, 1999). Gli anticorpi anti-CD3 e anti-CD28 uniti alla stessa perla fungono da cellula presentante antigene (APC) "surrogata". In altre realizzazioni i linfociti T possono essere attivati e stimolati a proliferare con cellule feeder e con appropriati anticorpi e citochine con l'ausilio di metodi come quelli descritti in US6,040,177, US5,827,642 e WO2012129514.

In altre realizzazioni si usano APC artificiali (aAPC) create per ingegneria di cellule K562, U937, 721.221, T2 e C1R per dirigere l'espressione stabile e la secrezione di svariate citochine e molecole co-stimolatrici. In una particolare realizzazione si usano aAPC da K32 o U32 per dirigere l'esposizione di una o più molecole stimolatrici basate su anticorpo sulla superficie cellulare delle aAPC. L'espressione di varie combinazioni di geni su una aAPC permette una precisa determinazione dei requisiti di attivazione dei linfociti T umani, così da poter tagliare su misura le aAPC per una propagazione ottimale di sottoinsiemi di

linfociti T con specifici requisiti di crescita e funzioni differenti. Le aAPC supportano la crescita *ex vivo* e l'espansione a lungo termine di linfociti T CD8 umani funzionali senza imporre l'aggiunta di citochine esogene, a differenza dell'uso delle APC naturali. Le popolazioni dei linfociti T possono essere espanse tramite aAPC esprimenti svariate molecole co-stimolatorie, tra cui a senza limitazioni CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L) e/o CD80 o CD86. Infine le aAPC forniscono un efficiente piattaforma per espandere linfociti T geneticamente modificati e per mantenere l'espressione di CD28 su linfociti T CD8. Si forniscono aAPC in WO03/057171 e in US2003/0147869A1, che si intendono incorporati per riferimento nella loro interezza.

In una realizzazione si trasducono cellule CD34⁺ con un costrutto di acido nucleico secondo l'invenzione. In certe realizzazioni le cellule CD34⁺ trasdotte si differenziano in cellule effettrici immunitarie mature *in vivo* in seguito alla somministrazione a un soggetto, in genere il soggetto dal quale le cellule erano state originariamente isolate. In un'altra realizzazione si possono stimolare cellule CD34⁺ *in vitro* prima dell'esposizione a un CAR o dopo la modifica genetica con esso come descritto in questa sede, con una o più delle

seguenti citochine: ligando Flt-3 (FLT3), fattore delle cellule staminali (SCF), fattore di crescita e differenziazione dei megacariociti (TPO), IL-3 e IL-6, in accordo con metodi descritti in passato (Asheuer et al., 2004; Imren et al., 2004).

L'invenzione fornisce una popolazione di cellule effettrici immunitarie modificate per il trattamento del cancro, le cellule effettrici immunitarie modificate comprendendo un CAR come qui esposto. Ad esempio si prepara una popolazione di cellule effettrici immunitarie modificate a partire da cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC) ottenute da un paziente diagnosticato con malignità ai linfociti B come descritto in questa sede (donatore autologo). Le PBMC costituiscono una popolazione eterogenea di linfociti T, che possono essere CD4⁺, CD8⁺, oppure CD4⁺ e CD8⁺.

Le PBMC possono inoltre includere altri linfociti citotossici, come cellule NK o cellule NKT. Un vettore di espressione comprendente un promotore, ad esempio un promotore MND, e la sequenza di codifica di un CAR qui contemplato può essere introdotto in una popolazione di linfociti T, cellule NK o cellule NKT da donatore umano. I linfociti T trasdotti con successo che portano il vettore di espressione possono essere

ripartiti tramite citometria a flusso per isolare linfociti T positivi a CD3 e in seguito ulteriormente propagati per aumentare il numero di tali proteine CAR esprimenti linfociti T, oltre all'attivazione delle cellule con l'ausilio di anticorpi anti-CD3 e/o anticorpi anti-CD28 e IL-2 o con qualsiasi altro metodo noto nel settore, come descritto altrove in questa sede. Si usano procedure standard per la crioconservazione di linfociti T esprimenti i linfociti T con proteina CAR a scopo di conservazione e/o preparazione per l'uso in un soggetto umano. In una realizzazione la trasduzione *in vitro*, la coltura e/o l'espansione dei linfociti T si eseguono in assenza di prodotti derivati da animali non umani come siero fetale di vitello e siero fetale bovino. Considerato che la popolazione eterogenea di PBMC è geneticamente modificata, le cellule trasdotte risultanti costituiscono una popolazione eterogenea di cellule modificate comprendente un CAR puntato e specifico per un antigene come contemplato in questa sede.

In un'ulteriore realizzazione si può usare una miscela ad esempio di uno, due, tre, quattro, cinque o più vettori di espressione differenti nella modifica genetica di una popolazione donatrice di cellule effettrici immunitarie in cui ciascun vettore codifichi una

differente proteina con recettore antigenico chimerico come qui contemplato. Le cellule effettrici immunitarie modificate risultanti costituiscono una popolazione mista di cellule modificate con una proporzione delle cellule modificate che esprime più di una proteina CAR differente.

In una realizzazione l'invenzione fornisce un metodo per conservare cellule effettrici immunitarie esprimenti proteine CAR murine, umane o umanizzate geneticamente modificate, compresa la crioconservazione delle cellule effettrici immunitarie in maniera che le cellule rimangano vitali una volta scongelate. Una frazione delle cellule effettrici immunitarie che esprimono le proteine CAR può essere crioconservata tramite metodi noti nel settore per fornire una fonte permanente di tali cellule a scopo di trattamento futuro di pazienti affetti da cancro. Al bisogno le cellule effettrici immunitarie trasformate e crioconservate possono essere scongelate, coltivate ed espanse per ottenere altre simili cellule.

Ai presenti fini per "crioconservazione" si intende la conservazione di cellule con raffreddamento a temperature inferiori a zero, ad esempio (e tipicamente) a 77 K ovvero -196 °C (il punto di ebollizione dell'azoto liquido). Si usano spesso agenti crioprotettivi a

temperature inferiori allo zero per prevenire danni alle cellule che si conservano dovuti al congelamento a basse temperature o al riscaldamento a temperatura ambiente. Gli agenti crioconservanti e tassi di raffreddamento ottimali possono proteggere le cellule contro le lesioni. Gli agenti crioprotettivi che si possono usare includono a titolo non limitativo dimetilsolfossido (DMSO) (Lovelock e Bishop, *Nature*, 1959, 183:1394-1395; Ashwood-Smith, *Nature*, 1961, 190:1204-1205), glicerolo, polivinilpirrolidina (Rinfret, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1960, 85:576) e glicole polietilenico (Sloviter e Ravdin, *Nature*, 1962, 196:48). Il tasso di raffreddamento preferito rientra tra 1 e 3 °C/minuto. Dopo almeno due ore i linfociti T avranno raggiunto una temperatura di -80 °C e potranno essere posti direttamente in azoto liquido (-196 °C) a scopo di conservazione permanente, ad esempio in un recipiente di conservazione criogenica a lungo termine.

H. Composizioni e formulazioni

Le composizioni qui contemplate possono comprendere uno o più polipeptidi, polinucleotidi, vettori comprendenti gli stessi, cellule effettrici immunitarie geneticamente modificate, eccetera, come contemplato in questa sede. Le composizioni includono a titolo non limitativo composizioni farmaceutiche. Per

“composizione farmaceutica” si intende una composizione formulata in soluzioni farmaceuticamente accettabili o fisiologicamente accettabili a scopo di somministrazione a una cellula o a un animale, da sole o in combinazione con una o più altre modalità di terapia. Resterà inteso inoltre che se desiderato le composizioni dell’invenzione potranno essere somministrate in combinazione anche con altri agenti, tra cui ad esempio citochine, fattori di crescita, ormoni, piccole molecole, agenti chemioterapici, profarmaci, farmaci, anticorpi, o vari altri agenti farmaceuticamente attivi. Non esistono virtualmente limiti agli altri componenti che possono essere anch’essi inclusi nelle composizioni, a patto che gli agenti aggiuntivi non pregiudichino la capacità della composizione di erogare la terapia voluta.

L’espressione “farmaceuticamente accettabile” si utilizza in questa sede in riferimento a quei composti, materiali, composizioni e/o forme di dosaggio che entro i confini di un fondato giudizio medico sono idonei per l’uso a contatto con i tessuti di esseri umani e animali senza eccessiva tossicità, irritazione, risposta allergica o altri problemi o complicazioni, il tutto commisurato a un ragionevole rapporto beneficio/rischio.

Ai presenti fini un "veicolo, diluente o eccipiente farmaceuticamente accettabile" include a titolo non limitativo qualsiasi adiuvante, veicolo, eccipiente, lubrificante, agente dolcificante, diluente, conservante, tintura/colorante, intensificatore del sapore, tensioattivo, agente umidificante, agente disperdente, agente di sospensione, stabilizzante, agente isototonico, solvente, tensioattivo o emulsionante che sia stato approvato dalla Food and Drug Administration degli Stati Uniti come accettabile per l'uso in esseri umani o animali domestici. Gli esempi di veicoli farmaceuticamente accettabili includono a titolo non limitativo: zuccheri, come lattosio, glucosio e saccarosio; amidi, come amido di mais e amido di patate; cellulosa e suoi derivati, come sodio carbossimetilcellulosa, etilcellulosa e acetato di cellulosa; gomma adragante; malto; gelatina; talco; burro di cacao, cere, grassi animali e vegetali, paraffine, siliconi, bentoniti, acido silicico, ossido di zinco; oli, come olio di arachidi, olio di semi di cotone, olio di zafferanone, olio di sesamo, olio d'oliva, olio di mais e olio di soia; glicoli come il glicole propileno; polioli come glicerina, sorbitolo, mannitolo e glicole polietilenico; esteri come oleato di etile e laurato di etile; agar; agenti tampone come idrossido

di magnesio e idrossido di alluminio; acido alginico; acqua priva di pirogeno; soluzione salina isotonica; soluzione di Ringer; alcool etilico; soluzioni con tampone fosfato; e qualsiasi altra sostanza compatibile utilizzata in formulazioni farmaceutiche.

In particolari realizzazioni le composizioni della presente invenzione comprendono una quantità di cellule effettrici immunitarie geneticamente modificate qui contemplate. Ai presenti fini l'espressione "quantità" significa una "quantità efficace" o una "efficace quantità" di una cellula terapeutica geneticamente modificata, ad esempio un linfocita T, per ottenere un risultato profilattico o terapeutico benefico o desiderato, compresi risultati clinici.

Per "quantità profilatticamente efficace" si intende una quantità di una cellula terapeutica geneticamente modificata che sia efficace a ottenere il risultato profilattico desiderato. Tipicamente ma non necessariamente, dato che si usa una dose profilattica in soggetti prima o in una fase precoce della malattia, la quantità profilatticamente efficace è inferiore alla quantità terapeuticamente efficace.

Una "quantità terapeuticamente efficace" di una cellula terapeutica geneticamente modificata può variare in base a fattori come lo stato di malattia, l'età, il

sesso e il peso dell'individuo, oltre alla capacità delle cellule staminali e progenitrici di suscitare una risposta desiderata nell'individuo. Una quantità terapeuticamente efficace è inoltre una quantità in cui ogni eventuale effetto tossico o nocivo del virus o delle cellule terapeutiche trasdotte è più che controbilanciato dagli effetti terapeutici favorevoli. L'espressione "quantità terapeuticamente efficace" include una quantità efficace a "trattare" un soggetto (ad esempio un paziente). Quando si indica una quantità terapeutica la quantità precisa delle composizioni della presente invenzione da somministrare può essere determinata da un medico tenendo conto delle differenze individuali in età, peso, dimensioni del tumore, entità di infezione o metastasi, e condizione del paziente (soggetto). In generale si può affermare che una composizione farmaceutica comprendente i linfociti T qui descritti può essere somministrata a un dosaggio compreso tra 10^2 e 10^{10} cellule per kg di peso corporeo, preferibilmente tra 10^5 e 10^6 cellule per kg di peso corporeo, compreso ogni valore intero entro tali intervalli. Il numero di cellule dipenderà dall'uso definitivo al quale è destinata la composizione, oltre al tipo di cellule incluse nella stessa. Per gli usi previsti in questa sede le cellule si

trovano generalmente in un volume di un litro o meno, che può essere 500 ml o meno o anche 250 ml o 100 ml o meno. La densità delle cellule desiderate sarà quindi tipicamente maggiore di 10^6 cellule/ml e generalmente maggiore di 10^7 cellule/ml, in genere 10^8 cellule/ml o maggiore. Il numero clinicamente rilevante di cellule immunitarie può essere ripartito in più infusioni che cumulativamente raggiungano o superino 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} o 10^{12} cellule. In alcuni aspetti della presente invenzione, in particolare laddove le cellule infuse saranno ridirette a un particolare antigene bersaglio (ad esempio la catena leggera κ o λ), si possono usare numeri di cellule più bassi, dell'ordine di 10^6 per chilogrammo (10^6 - 10^{11} per paziente). Si possono somministrare composizioni cellulari espressioni CAR più volte in dosaggi entro tali intervalli. Le cellule possono essere allogeniche, singeniche, xenogeniche o autologhe al paziente sottoposto a terapia. Se desiderato il trattamento può inoltre includere la somministrazione di mitogeni (ad esempio PHA) o linfochine, citochine e/o chemochine (ad esempio IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α , IL-18, e TNF- β , GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α , eccetera) come descritto in questa sede per potenziare l'induzione della risposta immunitaria.

In generale le composizioni comprendenti le cellule attivate ed espanse come descritto in questa sede possono essere utilizzate nel trattamento e nella prevenzione di malattie che sorgano in individui immunocompromessi. In particolare le composizioni comprendenti i linfociti T modificati con CAR qui contemplati trovano uso nel trattamento del cancro. I linfociti T modificati con CAR della presente invenzione possono essere somministrati da soli o come composizione farmaceutica in combinazione con veicoli, diluenti, eccipienti e/o con altri componenti come IL-2 o altre citochine o popolazioni cellulari. In particolari realizzazioni le composizioni farmaceutiche qui contemplate comprendono una quantità di linfociti T geneticamente modificati in combinazione con uno o più veicoli, diluenti o eccipienti farmaceuticamente o fisiologicamente accettabili.

Le composizioni farmaceutiche della presente invenzione comprendenti una popolazione di cellule effettrici immunitarie esprimenti CAR, come linfociti T, possono comprendere tamponi come soluzione salina con tampone neutro, soluzione salina con tampone fosfato e simili; carboidrati come glucosio, mannosio, saccarosio o destrani, e mannitolo; proteine; polipeptidi o amminoacidi come la glicina; antiossidanti; agenti

chelanti come EDTA o glutatione; adiuvanti (ad esempio idrossido di alluminio); e conservanti. Le composizioni della presente invenzione sono preferibilmente formulate a scopo di somministrazione parenterale, ad esempio intravascolare (intravenosa o intraarteriale) o di somministrazione intraperitoneale o intramuscolare.

Le composizioni farmaceutiche liquide, siano esse soluzioni, sospensioni o altre forme simili, possono includere uno o più tra i seguenti: diluenti sterili come acqua per iniezione, soluzione salina, preferibilmente soluzione salina fisiologica, soluzione di Ringer, cloruro di sodio isotonic, oli fissati come mono- o digliceridi sintetici che possono fungere da solvente o mezzo di sospensione, glicoli polietilenici, glicerina, glicole propilenico o altri solventi; agenti antibatterici come alcool benzilico o metilparabene; antiossidanti come acido ascorbico o bisolfito di sodio; agenti chelanti come l'acido etilenediamminatetraacetico; tamponi come acetati, citrati o fosfati e agenti per la regolazione della tonicità come cloruro di sodio o destrosio. La preparazione parenterale può essere racchiusa in ampolle, siringhe monouso o fiale a multiple dosi costituite da vetro o plastica. Una composizione farmaceutica iniettabile è

preferibilmente sterile.

In una particolare realizzazione le composizioni qui contemplate comprendono una quantità efficace di cellule effettrici immunitarie esprimenti CAR, da sole o in combinazione con uno o più agenti terapeutici. Le composizioni di cellule effettrici immunitarie esprimenti CAR possono quindi essere somministrate da sole o in combinazione con altri trattamenti noti per il cancro, tra cui terapia con radiazione, chemioterapia, trapianto, immunoterapia, terapia ormonale, terapia fotodinamica e così via. Le composizioni possono inoltre essere somministrate in combinazione con antibiotici. Tali agenti terapeutici possono essere accettati nel settore come trattamento standard per un particolare stato di malattia come qui descritto, ad esempio un particolare cancro. Gli esempi di agenti terapeutici contemplati includono citochine, fattori di crescita, steroidi, NSAID, DMARD, antinfiammatori, anticorpi chemioterapici, radioterapici e terapeutici, e altri agenti attivi e ausiliari.

In certe realizzazioni le composizioni comprendenti cellule effettrici immunitarie esprimenti CAR qui esposte possono essere somministrate in unione con un qualsiasi numero di agenti chemioterapici. Gli esempi illustrativi di agenti chemioterapici includono agenti

alchilanti come tiotepa e ciclofosfammide (CYTOXAN™); alchisolfonati come busulfano, improsulfano e piposulfano; aziridine come benzodopa, carboquone, meturedopa e uredopa; etilenimine e metilamelamine tra cui al-tretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamide, trietilenetiofosforamide e trimetilolomelamina; mostarde azotate come clorambucile, clornafazina, colofosfammide, estramustina, ifosfammide, mecloretamina, ossido cloridrato di mecloretamina, melfalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfammide, mostarda di uracile; nitrosuree come carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibiotici come le aclacinomisine, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicine, cactinomicina, calicheamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomucina, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-osso-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicine, acido mico-fenolico, nogalamicina, olivomicine, peplomicina, pot-firomicina, puromicina, chelamicina, rodorubicina, streptonigrina, streptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetaboliti come il metotrexato e il 5-fluorouracile (5-FU); analoghi dell'acido folico come denopterina, metotrexato,

pteropterina, trimetrexato; analoghi di purine come fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; analoghi di pirimidine come ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideossiridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; androgeni come calusterone, dromostanolone propionato, epitiostanolo, mepitiostano, testolattone; anti-adrenali come amminoglutetimmide, mitotano, trilostano; rigeneranti di acido folico come l'acido frolinico; aceglatone; aldofosfammide glicoside; acido aminolevulinico; amsacrina; bestrabucile; bisantrene; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquone; elformitina; acetato di elliptinio; etoglucide; nitrato di gallio; idrossiurea; lentinano; lonidamine; mitoguazone; mitoxantrone; mopidamolo; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; acido podofilinico; 2-etilidrazide; procarbазina; PSK®; razoxano; sizofirano; spirogermanio; acido tenuazonico; triaziqnone; 2,2',2''-triclорotrietilammina; uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitolo; mitolattolo; pipobromano; gacitosina; arabinoside ("Ara-C"); ciclofosfammide; tiotepa; tassoidi, ad esempio paclitaxel (TAXOL®, da Bristol-Myers Squibb Oncology di Princeton, N.J.) e doxetaxel (TAXOTERE®, da Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia);

clorambucile; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; analoghi del platino come il cisplatino e il carboplatino; vinblastina; platino; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitomicina C; mitoxantrone; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrone; teniposide; daunomicina; amminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inibitore della topoisomerasi RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); derivati dell'acido retinoico come Targretin™ (bexarotene), Panretin™ (alitretinoina); ONTAK™ (denileuchina diftitox); esperamicine; capecitabina; e sali, acidi o derivati farmaceuticamente accettabili di uno qualsiasi dei succitati. Si includono in questa definizione anche agenti anti-ormonali che agiscono nel senso di regolare o inibire l'azione ormonale su tumori, come gli anti-estrogeni, tra cui ad esempio tamoxifene, raloxifene, 4(5)-imidazoli inibitori dell'aromatasi, 4-idrossitamoxifene, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone e toremifene (Fareston); e anti-androgeni come flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide e goserelina; e sali, acidi o derivati farmaceuticamente accettabili di uno qualsiasi dei succitati.

Si possono usare svariati altri agenti terapeutici in unione con le composizioni qui descritte. In una realizzazione la composizione comprendente cellule

effettrici immunitarie esprimenti CAR viene somministrata con un agente antinfiammatorio. Gli agenti o farmaci antinfiammatori includono a titolo non limitativo steroidi e glucocorticoidi (compresi betametasone, budesonide, dexametasone, idrocortisone acetato, idrocortisone, metilprednisolone, prednisolone, prednisone, triamcinolone), farmaci antinfiammatori non steroidei (NSAIDS) tra cui aspirina, ibuprofene, naproxene, metotrexato, sulfasalazina, leflunomide, medicinali anti-TNF, ciclofosfamide e micofenolato. Altri NSAID esemplificativi sono selezionati dal gruppo consistente di ibuprofene, naproxene, naproxene sodio, inibitori di Cox-2 come VIOXX® (rofecoxib) e CELEBREX® (celecoxib), e sialilati. Gli esempi di analgesici sono selezionati dal gruppo consistente di acetaminofene, ossicodone, tramadolo e proporzifene cloridrato. Gli esempi di glucocorticoidi sono selezionati dal gruppo consistente di cortisone, dexametasone, idrocortisone, metilprednisolone, prednisolone e prednisone. Gli esempi di modificatori della risposta biologica includono molecole dirette contro marcatori della superficie cellulare (ad esempio CD4, CD5, eccetera), inibitori delle citochine, come gli antagonisti del TNF (ad esempio etanercept (ENBREL®), adalimumab (HUMIRA®) e infliximab (REMICADE®)),

inibitori delle chemochine e inibitori delle molecole di adesione. I modificatori della risposta biologica includono anticorpi monoclonali oltre a forme ricombinanti di molecole. Gli esempi di DMARD includono azatioprina, ciclofosfamide, ciclosporina, metotrexato, penicillamina, leflunomide, sulfasalazina, idrossiclorochina, oro (orale (auranofina) e intramuscolare) e minociclina.

Gli esempi illustrativi di anticorpi terapeutici idonei per la combinazione con i linfociti T modificati con CAR qui contemplati includono a titolo non limitativo abagovomab, adecatumumab, afutuzumab, alemtuzumab, altumomab, amatuximab, anatumomab, arcitumomab, bavituximab, bectumomab, bevacizumab, bivatuzumab, blinatumomab, brentuximab, cantuzumab, catumaxomab, cetuximab, citatuzumab, cixutumumab, clivatuzumab, conatumumab, daratumumab, drozitumab, durevoligotumab, dusigitumab, detumomab, dacetuzumab, dalotuzumab, ecromeximab, elotuzumab, ensituximab, ertumaxomab, etaracizumab, farietuzumab, ficlatuzumab, figitumumab, flanvotumab, futuximab, ganitumab, gentuzumab, girentuximab, glembatumumab, ibritumomab, igovomab, imgatuzumab, indatuximab, inotuzumab, intetumumab, ipilimumab, iratumumab, labetuzumab, lexatumumab, lintuzumab, lorvotuzumab, lucatumumab,

mapatumumab, matuzumab, milatuzumab, minretumomab, mitumomab, moxetumomab, narnatumab, naptumomab, necitumumab, nimotuzumab, nofetumomab, ocaratuzumab, ofatumumab, olaratumab, onartuzumab, oportuzumab, oregovomab, panitumumab, parsatuzumab, patritumab, pentumomab, pertuzumab, pintumomab, pritumumab, racotumomab, radretumab, rilotumumab, rituximab, robatumumab, satumomab, sibrotuzumab, siltuximab, simtuzumab, solitomab, tacatuzumab, taplitumomab, tenatumomab, teprotumumab, tigatuzumab, tositumomab, trastuzumab, tucotuzumab, ublituximab, veltuzumab, vorsetuzumab, votumumab, zalutumumab, CC49 e 3F8.

In certe realizzazioni le composizioni qui descritte si somministrano in unione con una citochina. Per "citochina" ai presenti fini si intende una denominazione generica per proteine rilasciate da una popolazione cellulare che agiscono su un'altra cellula come mediatori intercellulari. Sono esempi di tali citochine le linfocine, le monochine e i tradizionali ormoni polipeptidici. Tra le citochine si includono ormoni della crescita come l'ormone della crescita umano, l'ormone della crescita umano N-metionilato e l'ormone della crescita dei bovini; ormoni della paratiroide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; ormoni glicoproteici come l'ormone stimolante

dei follicoli (FSH), l'ormone stimolante della tiroide (TSH) e l'ormone luteinizzante (LH); fattore di crescita epatico; fattore di crescita dei fibroblasti; prolattina; lattogeno placentale; fattori di necrosi tumorale alfa e beta; sostanze inibitrici mulleriane; peptide associato alla gonadotropina del topo; inibina; attivina; fattore di crescita endoteliale vascolare; integrina; trombopoietina (TPO); fattori di crescita dei nervi come NGF-beta; fattore di crescita delle piastrine; fattori di crescita trasformanti (TGF) come TGF-alfa e TGF-beta; fattore di crescita tipo insulina I e II; eritropoietina (EPO); fattori osteoinduttivi; interferoni come l'interferone alfa, beta, e gamma; fattori di stimolazione di colonie (CSF) come il CSF dei macrofagi (M-CSF), il CSF dei granulociti-macrofagi (GM-CSF) e il CSF dei granulociti (G-CSF); interleuchine (IL) come IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15; fattori di necrosi tumorale come TNF-alfa e TNF-beta; e altri fattori polipeptidici tra cui LIF e il ligando kit (KL). Ai presenti fini il termine "citochina" include proteine da fonti naturali o da coltura cellulare ricombinante, oltre a equivalenti biologicamente attivi delle citochine di sequenza nativa.

I. Cellule e antigeni bersaglio

La presente invenzione contempla in parte cellule effettrici immunitarie geneticamente modificate ridirette verso una cellula bersaglio, ad esempio una cellula tumorale o cancerosa, comprendenti inoltre CAR che possiedono un dominio di legame che si lega da antigeni bersaglio sulle cellule. Ai presenti fini il termine "cancro" riguarda in generale una classe di malattie o condizioni in cui cellule anomale si suddividono senza controllo e possono invadere tessuti vicini. Le cellule cancerose possono inoltre diffondersi ad altre parti del corpo attraverso gli apparati sanguigno e linfatico. Esistono parecchi tipi principali di cancro. Il carcinoma è un cancro che inizia nella pelle o in tessuti che rivestono o ricoprono organi interni. Il sarcoma è un cancro che inizia nelle ossa, cartilagini, grasso, muscolo, vasi sanguigni o altro tessuto connettivo o di supporto. La leucemia è un cancro che inizia in tessuto formatore del sangue come il midollo osseo e causa la produzione di un gran numero di cellule sanguigne anomale e il loro ingresso nel sangue. Il linfoma e il mieloma multiplo sono forme di cancro che iniziano nelle cellule del sistema immunitario. Un cancro del sistema nervoso centrale è un cancro che inizia nei tessuti del cervello e del midollo spinale.

Ai presenti fini il termine "maligno" indica un cancro in cui un gruppo di cellule tumorali evidenzia una o più tra crescita incontrollata (ossia divisione oltre i limiti normali), invasione (ossia intrusione e distruzione di tessuti adiacenti) e metastasi (ossia diffusione ad altri punti nel corpo tramite la linfa o il sangue). Ai presenti fini il termine "metastatizzare" indica la diffusione di un cancro da una parte del corpo a un'altra. Un tumore formato da cellule che si sono diffuse è detto "tumore metastatico" o "metastasi". Il tumore metastatico contiene cellule che sono uguali a quelle del tumore originale (primario). Ai presenti fini il termine "benigno" o "non maligno" indica tumori che possono crescere ancora ma non diffondersi ad altre parti del corpo. I tumori benigni sono autolimitanti e tipicamente non invadono né metastatizzano.

Per "cellula cancerosa" o "cellula tumorale" si intende una singola cellula di una crescita o tessuto canceroso. Per "tumore" si intende generalmente un rigonfiamento o lesione costituita da una crescita anomala di cellule, che può essere benigna, pre-maligna o maligna. La maggior parte delle forme di cancro forma tumori, anche se alcune, ad esempio la leucemia, non formano necessariamente tumori. Per i casi di cancro

che formano tumori i termini "cancro" (o cellula cancerosa) e "tumore" (o cellula tumorale) si usano in senso intercambiabile. La quantità di un tumore in un individuo è il "carico tumorale", che può essere misurato come numero, volume o peso del tumore.

In una realizzazione la cellula bersaglio esprime un antigene, ad esempio un antigene bersaglio, che sostanzialmente non si trova sulla superficie di altre cellule normali (desiderate). In una realizzazione la cellula bersaglio è una cellula parenchimale pancreatica, cellula del dotto pancreatico, cellula epatica, cellula del muscolo cardiaco, cellula del muscolo scheletrico, osteoblasto, mioblasto scheletrico, neurone, cellula endoteliale vascolare, cellula del pigmento, cellula del muscolo liscio, cellula gliale, cellula di grasso, cellula ossea, condrocita, cellula delle isole pancreatiche, cellula del SNC, cellula del SNP, cellula del fegato, cellula adiposa, cellula renale, cellula polmonare, cellula cutanea, cellula ovarica, cellula follicolare, cellula epiteliale, cellula immunitaria o cellula endoteliale.

In certe realizzazioni la cellula bersaglio è parte di un tessuto pancreatico, tessuto neurale, tessuto cardiaco, midollo osseo, tessuto muscolare, tessuto osseo, tessuto cutaneo, tessuto epatico, follicoli

piliferi, tessuto vascolare, tessuto adiposo, tessuto polmonare o tessuto renale.

In una particolare realizzazione la cellula bersaglio è una cellula tumorale. In un'altra particolare realizzazione la cellula bersaglio è una cellula cancerosa, come una cellula in un paziente affetto da cancro. Gli esempi di cellule che possono essere uccise con i metodi esposti includono cellule dei tumori seguenti: un tumore liquido come una leucemia, compresa la leucemia acuta (tra cui la leucemia linfocitica acuta, la leucemia mielocitica acuta, la leucemia mieloblastica, promielocitica, mielomonocitica, monocitica e l'eritroleucemia), leucemie croniche (tra cui la leucemia mielocitica (granulocitica) cronica e la leucemia linfocitica cronica), policitemia vera, linfoma, morbo di Hodgkin, linfoma non Hodgkin, mieloma multiplo, macroglobulinemia di Waldenström, malattia delle catene pesanti).

In un'altra realizzazione la cellula è una cellula di tumore solido, come sarcomi e carcinomi, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogenico e altri sarcomi, sinovioma, mesotelioma, tumore di Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma del colon, cancro pancreatico, cancro della mammella, cancro ovarico, cancro della prostata,

carcinoma epatocellulare, cancro del polmone, cancro coloretale, carcinoma a cellule squamose, carcinoma a cellule basali, adenocarcinoma (ad esempio adenocarcinoma del pancreas, colon, ovaia, polmone, mammella, stomaco, prostata, cervice o esofago), carcinoma delle ghiandole sudoripare, carcinoma delle ghiandole sebacee, carcinoma papillare, adenocarcinomi papillari, carcinoma midollare, carcinoma broncogenico, carcinoma delle cellule renali, epatoma, carcinoma del dotto biliare, coriocarcinoma, tumore di Wilms, cancro cervicale, tumore testicolare, carcinoma della vescica o tumori del SNC (come un glioma, astrocitoma, medulloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, emangioblastoma, neuroma acustico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma e retinoblastoma). In una realizzazione il cancro è selezionato dal gruppo consistente di: tumore di Wilms, sarcoma di Ewing, un tumore neuroendocrino, un glioblastoma, un neuroblastoma, un melanoma, cancro della pelle, cancro della mammella, cancro del colon, cancro rettale, cancro della prostata, cancro del fegato, cancro renale, cancro pancreatico, cancro del polmone, cancro biliare, cancro cervicale, cancro endometriale, cancro esofageo, cancro gastrico, cancro della testa e del collo, carcinoma midollare della tiroide, cancro ovarico,

glioma, linfoma, leucemia, mieloma, leucemia linfoblastica acuta, leucemia mielogena acuta, leucemia mielogena cronica, leucemia mielogena cronica, linfoma di Hodgkin, linfoma non Hodgkin e cancro della vescica urinaria.

In una realizzazione la cellula bersaglio è una cellula maligna del fegato, pancreas, polmone, mammella, vescica, cervello, osso, tiroide, rene, pelle e sistema ematopoietico. In un'altra realizzazione la cellula bersaglio è una cellula in un cancro del fegato, cancro pancreatico, cancro del polmone, cancro della mammella, cancro della vescica, cancro del cervello, cancro osseo, cancro della tiroide, cancro del rene, cancro della pelle o cancroematologico.

In una realizzazione l'antigene bersaglio è un epitopo di un polipeptide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Mucl, Muc16, NCAM, ligandi

NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2.

J. Metodi terapeutici

I linfociti T geneticamente modificati qui contemplati forniscono metodi perfezionati di immunoterapia adottiva per l'uso nel trattamento di varie forme di tumore e di cancro. In particolari realizzazioni si ridirige la specificità di un linfocita T primario a cellule tumorali o cancerose modificando geneticamente il linfocita T primario con un CAR qui contemplato. In varie realizzazioni si usa un vettore virale per modificare geneticamente una cellula effettrice immunitaria con un polinucleotide comprendente un promotore MND e codificante un CAR che comprende un dominio di legame specifico per antigene che si lega a un polipeptide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Muc1, Muc16, NCAM, ligandi NKG2D,

NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2; un dominio cerniera; un dominio transmembrana comprendente un dominio TM derivato da un polipeptide selezionato dal gruppo consistente di: CD8 α , CD4, CD45, PD1 e CD152 e un breve linker oligo- o polipeptidico, preferibilmente di lunghezza tra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 amminoacidi che collega il dominio TM al dominio intracellulare di segnalazione del CAR; e uno o più domini di segnalazione co-stimolatori intracellulari selezionati dal gruppo consistente di CD28, CD134 e CD137; e un dominio di segnalazione primario CD3 ζ .

In una realizzazione la presente invenzione include un tipo di terapia cellulare in cui si modificano geneticamente linfociti T per esprimere un CAR che punti cellule cancerose esprimenti un antigene bersaglio, e si infonde il linfocita T con CAR in un ricevente bisognoso in tal senso. La cellula infusa è in grado di uccidere cellule tumorali nel ricevente. A differenza di quanto accade nelle terapie con anticorpi i linfociti T con CAR sono in grado di replicarsi *in vivo*, con conseguente persistenza a lungo termine che può condurre a una terapia prolungata contro il cancro. In una realizzazione i linfociti T con CAR dell'invenzione possono subire una robusta espansione di

linfociti T *in vivo* e possono persistere per un periodo di tempo esteso. In un'altra realizzazione i linfociti T con CAR dell'invenzione evolvono in specifici linfociti T della memoria che possono essere riattivati per inibire una eventuale ulteriore formazione o crescita di tumori.

In particolari realizzazioni, composizioni comprendenti una cellula effettrice immunitaria geneticamente modificata con un vettore comprendente un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide codificante un CAR si usano nel trattamento di forme solide di tumore o di cancro, tra cui a titolo non limitativo cancro del fegato, cancro pancreatico, cancro del polmone, cancro della mammella, cancro della vescica, cancro del cervello, cancro osseo, cancro della tiroide, cancro del rene o cancro della pelle.

In particolari realizzazioni, composizioni comprendenti una cellula effettrice immunitaria geneticamente modificata con un vettore comprendente un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide codificante un CAR che comprende un dominio di legame specifico per antigene che si lega a un epitopo di PSCA o MUC1 si usano per trattare cancro pancreatico.

In particolari realizzazioni, composizioni comprendenti una cellula effettrice immunitaria geneticamente

modificata con un vettore comprendente un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide codificante un CAR che comprende un dominio di legame specifico per antigene che si lega a un epitopo di EPHA2, EGFRvIII, o CSPG4 si usano per trattare glioblastoma multiforme.

In particolari realizzazioni, composizioni comprendenti una cellula effettrice immunitaria geneticamente modificata con un vettore comprendente un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide codificante un CAR che comprende un dominio di legame specifico per antigene che si lega a un epitopo di PSCA o MUC1 si usano per trattare cancro della vescica.

In particolari realizzazioni, composizioni comprendenti una cellula effettrice immunitaria geneticamente modificata con un vettore comprendente un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide codificante un CAR che comprende un dominio di legame specifico per antigene che si lega a un epitopo di PSCA o GD2 si usano per trattare cancro del polmone.

In particolari realizzazioni, composizioni comprendenti una cellula effettrice immunitaria geneticamente modificata con un vettore comprendente un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide

codificante un CAR che comprende un dominio di legame specifico per antigene che si lega a un epitopo di CSPG4 o HER2 si usano per trattare cancro della mammella, ad esempio cancro della mammella triplo negativo.

In particolari realizzazioni, composizioni comprendenti una cellula effettrice immunitaria geneticamente modificata con un vettore comprendente un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide codificante un CAR che comprende un dominio di legame specifico per antigene che si lega a un epitopo di GD2 o CSPG4 si usano nel trattamento del melanoma.

In particolari realizzazioni, composizioni comprendenti una cellula effettrice immunitaria geneticamente modificata con un vettore comprendente un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide che codifica un CAR si usano nel trattamento di tumori liquidi, tra cui a titolo non limitativo una leucemia, compresa la leucemia acuta (ad esempio ALL, AML, leucemia mieloblastica, promielocitica, mielomonocitica, monocitica ed eritroleucemia), leucemie croniche (ad esempio CLL, SLL, CML, HCL), policitemia vera, linfoma, morbo di Hodgkin, linfoma non Hodgkin, mieloma multiplo, macroglobulinemia di Waldenström e malattia della catena pesante.

In particolari realizzazioni, composizioni comprendenti una cellula effettrice immunitaria geneticamente modificata con un vettore comprendente un promotore MND operativamente collegato a un polinucleotide codificante un CAR si usano nel trattamento di malignità a linfociti B, tra cui a titolo non limitativo mieloma multiplo (MM), linfoma non Hodgkin (NHL) e leucemia mielogena cronica (CLL).

Il mieloma multiplo è una malignità ai linfociti B che colpisce la morfologia delle cellule del plasma mature, caratterizzato dalla trasformazione neoplastica di un singolo clone di questi tipi di cellule. Tali cellule del plasma proliferano nel midollo osseo e possono invadere osso adiacente e talvolta il sangue. Le forme varianti di mieloma multiplo includono mieloma multiplo manifesto, mieloma multiplo latente, leucemia delle cellule del plasma, mieloma non secretorio, mieloma a IgD, mieloma osteosclerotico, plasmocitoma solitario delle ossa e plasmocitoma extramidollare (si veda ad esempio Braunwald et al. (curatori), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15^a edizione, McGraw-Hill, 2001).

Il linfoma non Hodgkin comprende un ampio gruppo di forme di cancro ai linfociti (globuli bianchi). I linfomi non Hodgkin possono presentarsi a qualsiasi

età e sono spesso contraddistinti da linfonodi più grandi del normale, febbre e perdita di peso. Esistono parecchi tipi diversi di linfoma non Hodgkin. Ad esempio il linfoma non Hodgkin può essere suddiviso in tipi aggressivi (a crescita rapida) e indolenti (a crescita lenta). Sebbene i linfomi non Hodgkin possano derivare da linfociti B e linfociti T, ai presenti fini l'espressione "linfoma non Hodgkin" e "linfoma non Hodgkin ai linfociti B" si usano in senso intercambiabile. I linfomi non Hodgkin ai linfociti B (NHL) includono linfoma di Burkitt, leucemia mielogena cronica / piccolo linfoma linfocitico (CLL/SLL), grande linfoma diffuso ai linfociti B, linfoma follicolare, linfoma immunoblastico a grandi cellule, linfoma linfoblastico ai precursori B e linfoma alle cellule del mantello. I linfomi che si presentano dopo un trapianto di midollo osseo o di cellule staminali sono generalmente linfomi non Hodgkin ai linfociti B.

La leucemia linfocitica cronica (CLL) è un cancro indolente (a crescita lenta) che causa un lento aumento nei globuli bianchi immaturi, detti linfociti B o cellule B. Le cellule cancerose si diffondono attraverso il sangue e il midollo osseo e possono colpire anche i linfonodi o altri organi come il fegato e la milza. La CLL finisce per causare il collasso del midollo

osseo. Talvolta nelle fasi tardive della malattia la malattia è detta piccolo linfoma linfocitico.

In particolari realizzazioni si forniscono metodi comprendenti la somministrazione di una quantità terapeuticamente efficace di cellule effettrici immunitarie esprimenti CAR qui contemplate o di una composizione comprendente le stesse a un paziente bisognoso in tal senso, da sole o in combinazione con uno o più agenti terapeutici. In certe realizzazioni le cellule dell'invenzione sono usate nel trattamento di pazienti a rischio di sviluppare un cancro. Pertanto la presente invenzione fornisce metodi per il trattamento o la prevenzione di un cancro comprendenti la somministrazione a un soggetto bisognoso in tal senso di una quantità terapeuticamente efficace dei linfociti T modificati con CAR dell'invenzione.

Ai presenti fini i termini "individuo" e "soggetto" si usano spesso in senso intercambiabile e indicano qualsiasi animale che esibisca un sintomo di cancro e possa essere trattato con i vettori per terapia genica, agenti terapeutici a base cellulare e metodi esposti altrove in questa sede. I soggetti idonei (ad esempio pazienti) includono animali da laboratorio (come topi, ratti, conigli o cavie), animali da fattoria, e animali domestici o da compagnia (come gatti o cani). Sono inclusi primati

non umani e preferibilmente pazienti umani. I tipici soggetti includono pazienti umani che siano affetti da cancro, abbiano ricevuto una diagnosi di cancro, o siano a rischio di sviluppare un cancro.

Ai presenti fini il termine "paziente" indica un soggetto che abbia ricevuto una diagnosi di un particolare cancro che possa essere trattato con i vettori per terapia genica, agenti terapeutici a base cellulare e metodi esposti altrove in questa sede.

Ai presenti fini i termini "trattamento" o "trattare" includono ogni effetto benefico o desiderabile sui sintomi o sulla patologia di una malattia o condizione patologica, e può includere riduzioni anche minime in uno o più marcatori misurabili della malattia o condizione sottoposta a trattamento, ad esempio il cancro. Il trattamento può comportare facoltativamente la riduzione o miglioramento dei sintomi della malattia o condizione, o il ritardo dell'avanzare della malattia o condizione. Il "trattamento" non indica necessariamente la totale eradicazione o cura della malattia o condizione o dei sintomi a essa associati.

Ai presenti fini il termine "prevenire" e parole affini come "prevenuto", "prevenzione", eccetera indicano un approccio mirato a prevenire, inibire o ridurre la probabilità di occorrenza o ricorrenza di una malattia

o condizione, ad esempio il cancro. Indicano inoltre il ritardo della comparsa o ricorrenza di una malattia o condizione o il ritardo dell'occorrenza o ricorrenza dei sintomi di una malattia o condizione. Ai presenti fini il termine "prevenzione" e parole affini includono anche la riduzione dell'intensità, effetto, sintomi e/o carico di una malattia o condizione prima della comparsa o ricorrenza della malattia o condizione.

Per "potenziare" o "promuovere" o "aumentare" o "espandere" si intende generalmente la capacità di una composizione qui contemplata, ad esempio un linfocita T geneticamente modificato o un vettore codificante un CAR, di produrre, suscitare o provocare una risposta fisiologica (ossia effetti a valle) maggiore in confronto con la risposta causata da un veicolo o da una molecola/composizione di controllo. Una risposta fisiologica misurabile può includere un aumento nell'espansione, attivazione o persistenza di linfociti T e/o un aumento nella capacità di uccidere cellule cancerose, tra altri evidenti alla luce delle competenze del settore e della descrizione qui inclusa. Una quantità "aumentata" o "potenziata" è tipicamente una quantità "statisticamente significativa" e può includere un aumento che sia pari a 1,1, 1,2,

1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o più volte (ad esempio 500 o 1000 volte) (compreso ogni intero e frazione decimale entro e oltre 1, ad es. 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, eccetera) la risposta prodotta da un veicolo o composizione di controllo.

Per "diminuire" o "abbassare" o "attenuare" o "ridurre" o "alleviare" si intende generalmente la capacità di una composizione qui contemplata di produrre, suscitare o provocare una risposta fisiologica (ossia effetti a valle) minore in confronto con la risposta causata da un veicolo o da una molecola/composizione di controllo. Una quantità "diminuita" o "ridotta" è tipicamente una quantità "statisticamente significativa" e può includere una diminuzione che sia pari a 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o più volte (ad esempio 500 o 1000 volte) (compreso ogni intero e frazione decimale entro e oltre 1, ad es. 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, eccetera) la risposta (risposta di riferimento) prodotta da un veicolo o una composizione di controllo, o la risposta in una particolare stirpe cellulare.

Per "mantenere" o "conservare" o "mantenimento" o "assenza di variazioni" o "assenza di sostanziali variazioni" o "assenza di sostanziale diminuzione" si intende generalmente la capacità di una composizione qui

contemplata di produrre, suscitare o provocare una risposta fisiologica (ossia effetti a valle) minore in una cellula in confronto con la risposta causata da veicolo o da una molecola/composizione di controllo, o con la risposta in una particolare stirpe cellulare. Una risposta paragonabile è una risposta che non sia differente in modo significativo o differente in modo misurabile dalla risposta di riferimento.

In una realizzazione un metodo per il trattamento di un cancro in un soggetto bisognoso in tal senso comprende la somministrazione di una quantità efficace, ad esempio una quantità terapeuticamente efficace, di una composizione comprendente cellule effettrici immunitarie geneticamente modificate qui contemplate. La quantità e la frequenza di somministrazione saranno determinate in base a fattori come la condizione del paziente e il tipo e gravità della malattia del paziente, pure se si potranno determinare dosaggi appropriati per mezzo di prove cliniche.

In certe realizzazioni potrebbe essere desiderabile somministrare linfociti T attivati a un soggetto e successivamente prelevare di nuovo sangue (o eseguire un'aferesi), attivare linfociti T da esso secondo la presente invenzione e infondere nuovamente nel paziente tali linfociti T attivati ed espansi. Questo

processo potrà essere eseguito più volte a scadenze di alcune settimane. In certe realizzazioni i linfociti T possono essere attivati da prelievi di sangue compresi tra 10 cc e 400 cc. In certe realizzazioni si attivano linfociti T da prelievi di sangue di 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc, 100 cc, 150 cc, 200 cc, 250 cc, 300 cc, 350 cc, o 400 cc o più. Senza voler sottostare ad alcuna teoria, l'uso di questo protocollo con multipli prelievi di sangue e multiple reinfusioni può servire a escludere per selezione certe popolazioni di linfociti T.

La somministrazione delle composizioni qui contemplate può essere eseguita in qualsiasi maniera conveniente, tra cui l'inalazione per aerosol, iniezione, ingestione, trasfusione, impianto o trapianto. In una realizzazione preferita le composizioni si somministrano per via parenterale. Le espressioni "somministrazione parenterale" e "sommministrato per via parenterale" ai presenti fini indicano modalità di somministrazione diverse dalla somministrazione enterale e topica, in genere via iniezione, e includono a titolo non limitativo l'iniezione e infusione intravascolare, intravenosa, intramuscolare, intraarteriale, intratecale, intracapsulare, intraorbitale, intratumorale, intracardiaca, intradermica, intraperitoneale, trans-

tracheale, sottocutanea, sottocuticolare, intraarticolare, sottocapsulare, sottoaracnoide, intraspinale e intrasternale. In una realizzazione le composizioni qui contemplate vengono somministrate a un soggetto per iniezione diretta in un tumore, linfonodo o sito di infezione.

In una realizzazione, a un soggetto bisognoso in tal senso si somministra una quantità efficace di una composizione per aumentare una risposta immunitaria cellulare a un cancro nel soggetto. La risposta immunitaria può includere risposte immunitarie cellulari mediate da linfociti T citotossici in grado di uccidere cellule infette, risposte di linfociti T regolatori, e risposte di linfociti T helper. Possono inoltre essere indotte risposte immunitarie umorali, mediate principalmente da linfociti T helper in grado di attivare linfociti B portando di conseguenza alla produzione di anticorpi. Per analizzare il tipo di risposta immunitaria indotta dalle composizioni della presente invenzione si possono usare svariate tecniche, che sono ben descritte nell'arte, ad esempio in *Current Protocols in Immunology*, a cura di John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach e Warren Strober (2001), John Wiley & Sons, New York, N.Y.

Nel caso dell'uccisione mediata da linfociti T, il legame CAR-ligando avvia la segnalazione del CAR al linfocita T, con conseguente attivazione di svariate vie di segnalazione di linfociti T che inducono il linfocita T a produrre o rilasciare proteine in grado di indurre l'apoptosi delle cellule bersaglio tramite vari meccanismi. Tali meccanismi mediati da linfociti T includono a titolo non limitativo il trasferimento di granuli citotossici intracellulari dal linfocita T alla cellula bersaglio, la secrezione di linfociti T di citochine proinfiammatorie che possono indurre l'uccisione delle cellule bersaglio (direttamente o indirettamente via reclutamento di altre cellule effettrici killer) e l'up-regolazione dei ligandi di recettori della morte (ad esempio FasL) sulla superficie dei linfociti T, che induce l'apoptosi delle cellule bersaglio in seguito al legame al recettore della morte a loro affine (ad esempio Fas) sulla cellula bersaglio. In una realizzazione l'invenzione fornisce un metodo per trattare un soggetto che abbia ricevuto una diagnosi di cancro, comprendente il prelievo di cellule effettrici immunitarie dal soggetto, la modifica genetica di dette cellule effettrici immunitarie con un vettore comprendente un acido nucleico che codifica un CAR come qui contemplato, con conseguente produzione

di una popolazione di cellule effettrici immunitarie modificate, e la somministrazione della popolazione di cellule effettrici immunitarie modificate allo stesso soggetto. In una realizzazione preferita le cellule effettrici immunitarie includono linfociti T.

In certe realizzazioni la presente invenzione fornisce inoltre metodi per stimolare una risposta immunomodulatrice mediata da cellule effettrici immunitarie a una popolazione di cellule bersaglio in un soggetto, comprendente la fase di somministrazione al soggetto di una popolazione di cellule effettrici immunitarie esprimenti un costrutto di acido nucleico che codifica una molecola di CAR.

I metodi per somministrare le composizioni cellulari qui descritte includono qualsiasi metodo che sia efficace nel portare alla reintroduzione di cellule effettrici immunitarie geneticamente modificate *ex vivo* che esprimano direttamente un CAR dell'invenzione nel soggetto, o alla reintroduzione dei progenitori geneticamente modificati delle cellule effettrici immunitarie, che all'introduzione in un soggetto si differenziano in cellule effettrici immunitarie mature che esprimono il CAR. Un metodo comprende la trasduzione di linfociti T di sangue periferico *ex vivo* con un costrutto di acido nucleico in accordo con l'in-

venzione e il riporto delle cellule trasdotte nel soggetto.

In certe realizzazioni i polinucleotidi, polipeptidi o frammenti di polipeptide del recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso Erbb2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2, o anticorpi per gli stessi, sono parte di un metodo diagnostico abbinato, tipicamente per valutare se un soggetto o una popolazione di soggetti risponderà favorevolmente a uno specifico trattamento medico.

Ai presenti fini l'espressione "diagnostico abbinato" si riferisce a un test diagnostico collegato a un particolare CAR o a una particolare terapia con cellule effettrici immunitarie geneticamente modificate. In una particolare realizzazione i metodi e corredi diagnostici comprendono la rilevazione dei livelli di

espressione di un polipeptide o polinucleotide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Mucl, Muc16, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2 in un campione biologico in maniera tale da rendere possibile una celere identificazione di pazienti idonei per il trattamento secondo l'invenzione.

Ad esempio un dato agente terapeutico per un cancro (ad esempio CAR o cellule effettrici immunitarie geneticamente modificate esprimenti CAR qui contemplati) può essere identificato come idoneo per un soggetto o una certa popolazioni di soggetti in base al fatto che il soggetto o i soggetti abbiano uno o più biomarcatori selezionati per una data malattia o condizione. Gli esempi di biomarcatori includono marcatori del siero/tessuti, oltre a marcatori che possano essere

identificati mediante tecniche di imagingografia medica. In certe realizzazioni un frammento di polipeptide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2 (o un suo corrispondente polinucleotide) può fornire di per sé un biomarcatore del siero e/o tessuto che possa essere utilizzato per misurare un esito farmacologico o valutare la desiderabilità dell'uso di un farmaco in uno specifico soggetto o in una specifica popolazione di soggetti. In certi aspetti l'identificazione di un'indicazione trattabile esprime una sequenza polinucleotidica di un polipeptide o polinucleotide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR,

la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Mucl, Muc16, NCAM, ligandi NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, survivina, TAG72, le TEM o VEGFR2 può includere la caratterizzazione dell'espressione differenziale di quella sequenza, sia essa in un soggetto selezionato, un tessuto selezionato o altrimenti, come descritto in questa sede e noto nel settore.

In una particolare realizzazione i metodi qui contemplati comprendono la misurazione o quantificazione del livello di espressione di pre-mRNA, mRNA o proteina per un polipeptide di recettore alfa del folato, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, la famiglia EGFR compreso ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetale, FR α , GD2, GD3, glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, lambda, Lewis-Y, kappa, mesotelina, Mucl, Muc16, NCAM, ligandi

NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, sopravvivenza, TAG72, le TEM o VEGFR2 in un cancro in un soggetto. In una realizzazione si identifica un soggetto come avente un particolare cancro che possa essere trattato con le composizioni qui contemplate se l'espressione del marcatore è 10 volte, 25 volte, 50 volte, 100 volte o 1000 volte superiore od oltre in un campione biologico rispetto all'espressione del marcatore in un campione di controllo o in uno standard noto. In una particolare realizzazione si identifica un soggetto come avente un'indicazione trattabile se l'espressione di un biomarcatore in un campione biologico è rilevabile e l'espressione del marcatore è inferiore al livello di rilevazione in un campione di controllo o standard noto con l'ausilio dello stesso metodo.

La presenza, l'assenza o i livelli relativi dell'espressione di una proteina biomarcatrice in un potenziale cancro possono essere analizzati ad esempio mediante tecniche istochimiche, tecniche immunologiche, elettroforesi, analisi western blot, analisi FACS, citometria a flusso e simili. In aggiunta la presenza, l'assenza o i livelli relativi dell'espressione di RNA biomarcatore possono essere rilevati ad esempio con l'ausilio di tecniche PCR, analisi

northern blot, uso di idonee sonde oligonucleotidiche e simili.

Tutte le pubblicazioni, domande di brevetto e brevetti concessi citati in questa specifica si incorporano nella presente per riferimento come se ciascuna singola pubblicazione, domanda di brevetto o brevetto concesso sia specificamente e individualmente indicato come incorporato per riferimento.

Sebbene l'invenzione che precede sia stata descritta in certo dettaglio a titolo illustrativo ed esemplificativo a scopo di chiarezza e comprensione, alla luce degli insegnamenti di questa invenzione agli esperti del settore apparirà del tutto evidente la possibilità di apportare certe variazioni e modifiche alla stessa senza esulare dallo spirito o dalla portata delle rivendicazioni annesse. Si forniscono gli esempi che seguono a titolo unicamente illustrativo e non a titolo limitativo. Gli esperti del settore riconosceranno facilmente svariati parametri non critici che potranno essere alterati o modificati giungendo a risultati essenzialmente simili.

ESEMPI

ESEMPIO 1

COSTRUZIONE DI CAR

1. CAR specifico per CD19 (CAR pMND-CD19)

Si progettavano CAR specifici per CD19 in modo che contenessero un promotore MND operativamente collegato a un scFv anti-CD19, un dominio cerniera e uno transmembrana da CD8 α e un dominio co-stimolatore da CD137 seguito dal dominio intracellulare di segnalazione della catena CD3 ζ . Figura 1A: il CAR per CD19 comprende una sequenza di peptide segnale (SP) di CD8 α per l'espressione in superficie su cellule effettrici immunitarie. La sequenza polinucleotidica del CAR pMND-CD19 è presentata in SEQ ID N° 2 e la mappa vettoriale è mostrata in figura 2. In tabella 3 si mostrano identità, riferimento GenBank, nome della fonte e rimando per i vari segmenti nucleotidici del vettore lentivirale CAR pMND-CD19.

Tabella 3

Nucleotidi	Identità	Riferimento GenBank	Nome fonte	Rimando
1-185	Spina dorsale di plasmide pUC19	N° accesso L09137.2 nt 1-185	pUC19	New England Biolabs
185-222	Linker	Non applicabile	Sintetico	Non applicabile
223-800	CMV	Non applicabile	pHCMV	(1994) <i>PNAS</i> 91:9564-68
801-1136	Sequenze di packaging di R, U5, PBS	N° accesso M19921.2 nt 454-789	pNL4-3	Maldarelli et al. (1991), <i>J. Virol.</i> 65(11):5732-43
1137-1139	Codone di avvio di gag (ATG) cambiato in codone di arresto (TAG)	Non applicabile	Sintetico	Non applicabile

1140-1240	Sequenza di gag da HIV-1	N° accesso M19921.2 nt 793-893	pNL4-3	Maldarelli et al. (1991), <i>J. Virol.</i> 65(11):5732-43
1241-1243	Sequenza di gag da HIV-1 cambiata in secondo codone di arresto	Non applicabile	Sintetico	Non applicabile
1244-1595	Sequenza di gag da HIV-1	N° accesso M 19921.2 nt 897-1248	pNL4-3	Maldarelli et al. (1991), <i>J. Virol.</i> 65(11):5732-43
1596-1992	cPPT/CTS di pol da HIV-1	N° accesso M19921.2 nt 4745-5125	pNL4-3	Maldarelli et al. (1991), <i>J. Virol.</i> 65(11):5732-43
1993-2517	Regione env HXB3 isolata da HIV-1 (RRE)	N° accesso M14100.1 nt 1875-2399	PgTAT-CMV	M.H. Malim, <i>Nature</i> (1988) 335:181-183
2518-2693	Sequenze S/A di env da HIV-1	N° accesso M19921.2 nt 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli et al. (1991), <i>J. Virol.</i> 65(11):5732-43
2694-3231	MND	Non applicabile	pccl-c-MNDU3c-x2	Challita et al. (1995), <i>J. Virol.</i> 69:748-755
3232-3247	Linker	Non applicabile	Sintetico	Non applicabile
3248-3310	Peptide segnale	N° accesso NM_001768	Sintetico	Non applicabile
3311-4036	scFv da CD19 (FMC63)	Non applicabile	Sintetico	Non applicabile
4037-4243	Cerniera e TM da CD8 α	N° accesso NM_001768	Sintetico	Milone et al. (2009), <i>Mol. Ther.</i> 17(8):1453-64
4244-4369	Dominio di segnalazione da CD137 (4-1BB)	N° accesso NM_001561	Sintetico	Milone et al. (2009), <i>Mol. Ther.</i> 17(8):1453-64
4370-4708	Dominio di segnalazione da CD3 ζ	N° accesso NM_000734	Sintetico	Milone et al. (2009), <i>Mol. Ther.</i> 17(8):1453-64
4709-4838	ppt da HIV-1 e parte di U3 3'	N° accesso M19921.2 nt 9005-9110	pNL4-3	Maldarelli et al. (1991), <i>J. Virol.</i> 65(11):5732-43
4839-4935	R da HIV-1 e parte di U3 3' (del. 399 bp in U3)	N° accesso M19921.2 nt 9511-9627	pNL4-3	Maldarelli et al. (1991), <i>J. Virol.</i> 65(11):5732-43
4936-4961	poliA sintetico	Non applicabile	Sintetico	Levitt, <i>N. Genes & Dev.</i> (1989), 3:1019-1025

4962-5010	Linker	Non applicabile	Sintetico	Non applicabile
5011-7425	Spina dorsale di pUC19	N° accesso L09137.2 nt 2636-2686	pUC19	New England Biolabs

2. Car specifico per catena leggera kappa (κ_{LC}) (CAR pMND-kappa)

Si progettavano CAR specifici per catena leggera kappa in modo che contenessero un promotore MND operativamente collegato a un scFv anti-catena leggera kappa, un dominio cerniera e uno transmembrana da CD8 α e un dominio co-stimolatore da CD137 seguito dal dominio intracellulare di segnalazione della catena CD3 ζ . Figura 1B: il CAR per κ_{LC} comprende una sequenza di peptide segnale (SP) di CD8 α per l'espressione in superficie su cellule effettrici immunitarie. La sequenza polinucleotidica del CAR pMND-kappa $_{LC}$ è presentata in SEQ ID N° 3 e la mappa vettoriale è mostrata in figura 3. In tabella 4 si mostrano identità, riferimento GenBank, nome della fonte e rimando per i vari segmenti nucleotidici del vettore lentivirale CAR per catena leggera pMND-kappa.

Tabella 4

Nucleotidi	Identità	Riferimento GenBank	Nome fonte	Rimando
1-185	Spina dorsale di pUC19	N° accesso L09137.2 nt 1-185	pUC19	New England Biolabs
185-222	Linker	Non applicabile	Sintetico	Non applicabile

223-800	CMV	Non applicabile	pHCMV	(1994) PNAS 91:9564-68
801-1136	Sequenze di packaging di R, U5, PBS	N° accesso M19921.2 nt 454-789	pNL4-3	Maldarelli et al. (1991), <i>J. Virol.</i> 65(11):5732-43
1137-1139	Codone di avvio di gag (ATG) cambiato in codone di arresto (TAG)	Non applicabile	Sintetico	Non applicabile
1140-1240	Sequenza di gag da HIV-1	N° accesso M19921.2 nt 793-893	pNL4-3	Maldarelli et al. (1991), <i>J. Virol.</i> 65(11):5732-43
1241-1243	Sequenza di gag da HIV-1 cambiata in secondo codone di arresto	Non applicabile	Sintetico	Non applicabile
1244-1595	Sequenza gag da HIV-1	N° accesso M19921.2 nt 897-1248	pNL4-3	Maldarelli et al. (1991), <i>J. Virol.</i> 65(11):5732-43
1596-1992	cPPT/CTS di pol da HIV-1	N° accesso M19921.2 nt 4745-5125	pNL4-3	Maldarelli, et al. (1991), <i>J. Virol.</i> 65(11):5732-43
1993-2517	Regione env HXB3 isolata da HIV-1 (RRE)	N° accesso M14100.1 nt 1875-2399	PgTAT-CMV	M.H. Malim, <i>Nature</i> (1988) 335:181-183
2518-2693	Sequenze S/A di env da HIV-1	N° accesso M19921.2 nt 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli et al. (1991), <i>J. Virol.</i> 65(11):5732-43
2694-3231	MND	Non applicabile	pccl-c-MNDU3c-x2	Challita et al. (1995), <i>J. Virol.</i> 69:748-755
3232-3245	Linker	Non applicabile	Sintetico	Non applicabile
3246-3302	Peptide segnale		Sintetico	Non applicabile
3303-4061	scFv di kappa	Non applicabile	Sintetico	Non applicabile
4062-4268	Cerniera e TM da CD8 α	N° accesso NM_001768	Sintetico	Milone et al. (2009), <i>Mol. Ther.</i> 17(8):1453-64
4269-4394	Dominio di segnalazione da CD137 (4-1BB)	N° accesso NM_001561	Sintetico	Milone et al. (2009), <i>Mol. Ther.</i> 17(8):1453-64
4395-4733	Dominio di segnalazione da CD3 ζ	N° accesso NM_000734	Sintetico	Milone et al. (2009), <i>Mol. Ther.</i> 17(8):1453-64

4734-4960	ppt, U3, e R da HIV-1	N° accesso M19921.2 nt 9005-9110	pNL4-3	Maldarelli et al. (1991), <i>J. Virol.</i> 65(11):5732-43
4961-4985	poliA sintetico	Non applicabile	Sintetico	Levitt, N. <i>Genes & Dev.</i> (1989), 3:1019-1025
4986-5025	Linker	Non applicabile	Sintetico	Non applicabile
5026-7450	Spina dorsale di pUC19	N° accesso L09137.2 nt 2636-2686	pUC19	New England Biolabs

ESEMPIO 2

TRASDUZIONE DI LINFOCITI T

Si producevano surnatanti con vettore lentivirale (LV) in cellule HEK 293T come già descritto in letteratura (Naldini et al., 1996; Dull et al., 1998; e Zufferey et al., 1998). Si usava la trasfezione transiente di 5 plasmidi (HPV275 codificante gag-pol di HIV, ψ N 15 codificante proteina dell'involucro VSV-G, p633 codificante la proteina rev di HIV, HPV601 codificante la proteina tat di HIV, e il vettore di espressione CAR) come descritto nella Pubblicazione PCT n° WO2012/170911. Si concentravano poi i surnatanti con LV tramite ultracentrifugazione o colonna a scambio ionico seguita da filtrazione a flusso tangenziale (TFF), si formulavano in mezzo SCGM (da CellGenix Inc., DE) e si crioconservavano a meno di -70 °C in criofiale monouso. Si determinavano i titoli infettivi via analisi citometrica a flusso di cellule di osteosarcoma umano (HOS) trasdotte (Kutner et al., 2009,

Nature Protocols 4:495-505). Per la trasduzione dei linfociti T umani si isolavano linfociti T umani primari da donatori volontari sani in seguito a leucoaferesi tramite selezione negativa con l'ausilio di corredi RosetteSep (da Stem Cell Technologies). Si coltivavano i linfociti T in RPMI 1640 con supplemento del 10% di FCS, 100 U/ml di penicillina, 100 g/ml di solfato di streptomicina e 10 mM di HEPES, indi si stimolavano con perle magnetiche rivestite con anticorpi anti-CD3/anti-CD28 a un rapporto cellule/perle pari a 1:3. Per i linfociti T CD8 si aggiungeva IL-2 umana (da Chiron) a giorni alterni a una concentrazione finale di 30 IU/ml. Circa 24 ore dopo l'attivazione si trasducevano i linfociti T con vettori lentivirali a una MOI pari a 5. Si valutava la trasduzione dei linfociti T tramite reazione a catena della polimerasi con l'ausilio di inneschi specifici per il vettore virale e tramite citometria a flusso da 7 a 10 giorni dopo la trasduzione.

ESEMPIO 3

VCN DI LINFOCITI T TRASDOTTI CON CAR

Si determinava il numero di copie di vettori per la trasduzione di linfociti T umani primari con lentivirus con CAR pMND-kappa_{LC}. Si raccoglievano cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC) da donatori

normali e si attivavano via coltivazione con anticorpi specifici per CD3 e CD28 (da Miltenyi Biotec) in mezzo contenente IL-2 (da CellGenix). Dopo l'attivazione si trasducevano le colture di PBMC con vettori lentivirali o si lasciavano senza trattamento. Si mantenevano le colture per permettere l'attecchimento e l'espansione dei linfociti T (7-10 giorni). Al momento della raccolta le colture comprendevano linfociti T che si erano espansi per circa 2 ragioni logaritmiche.

Il numero di copie di vettori (VCN) delle particelle lentivirali integrate si determinava via q-PCR nove giorni dopo la trasduzione. Il VCN medio su 12 colture uniche da 6 donatori era pari a 3,1 (figura 4).

ESEMPIO 4

ESPRESSIONE DI CAR IN LINFOCITI T TRASDOTTI

Si determinava l'espressione sulla superficie cellulare di recettori antigenici chimerici specifici per kappa espressi da un promotore MND (CAR pMND-kappa_{LC}) su linfociti T umani primari. Si raccoglievano cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC) da donatori normali e si attivavano via coltivazione con anticorpi specifici per CD3 e CD28 (da Miltenyi Biotec) in mezzo contenente IL-2 (da CellGenix). Dopo l'attivazione si trasducevano le colture di PBMC con vettori lentivirali o si lasciavano senza trattamento. Si mantenevano

le colture per permettere l'attecchimento e l'espansione dei linfociti T (7-10 giorni). Al momento della raccolta le colture comprendevano linfociti T che si erano espansi per circa 2 ragioni logaritmiche.

Si determinava l'espressione di Kappa_{LC} tramite citometria a flusso usando anticorpi specifici per Ig di topo (da BD Biosciences), che sono presenti solo su linfociti T modificati con CAR per pMND-kappa_{LC}. Si eseguiva la citometria a flusso da 6 a 9 giorni dopo la trasduzione. Il livello medio di espressione di kappa_{LC} su 12 colture uniche da 6 donatori era pari al 35,6% (figura 5).

ESEMPIO 5

IL PROMOTORE MND STIMOLA L'ESPRESSIONE DI CAR IN LINFOCITI T IN
MODO PARAGONABILE AL PROMOTORE EF1 α

L'espressione di CAR per CD19 spinta dal promotore MND su linfociti T modificati era comparabile all'espressione del CAR per CD19 spinta da promotore EF1 α . Si raccoglievano cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC) da donatori normali e si attivavano via coltivazione con anticorpi specifici per CD3 e CD28 (da Miltenyi Biotec) in mezzo contenente IL-2 (da Cell-Genix). Dopo l'attivazione si trasducevano le colture di PBMC con vettori lentivirali o si lasciavano senza trattamento. Si mantenevano le colture per permettere

l'attecchimento e l'espansione dei linfociti T (7-10 giorni). Al momento della raccolta le colture comprendevano linfociti T che si erano espansi per circa 2 ragioni logaritmiche.

Alla fine della coltura si valutava la trasduzione dei linfociti T tramite reazione a catena quantitativa della polimerasi (qPCR) con uso di inneschi specifici per le particelle virali. Si determinava l'espressione di CAR per CD19 sei giorni dopo la trasduzione tramite citometria a flusso usando anticorpi specifici per Ig di topo (da BD Biosciences), che sono presenti solo su linfociti T modificati con CAR per CD19. L'espressione del CAR per CD19 e il VCN erano entrambi paragonabili tra i differenti costrutti (figura 6).

ESEMPIO 6

REATTIVITÀ SPECIFICA PER ANTIGENE DI LINFOCITI T CON CAR

Si determinava la reattività specifica per l'antigene di linfociti T con CAR pMND-kappa_{LC}. Si raccoglievano cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC) da donatori normali e si attivavano via coltivazione con anticorpi specifici per CD3 e CD28 (da Miltenyi Biotec) in mezzo contenente IL-2 (da CellGenix). Dopo l'attivazione si trasducevano le colture di PBMC con vettori lentivirali o si lasciavano senza trattamento. Si mantenevano le colture per permettere

l'attecchimento e l'espansione dei linfociti T (7-10 giorni). Al momento della raccolta le colture comprendevano linfociti T che si erano espansi per circa 2 ragioni logaritmiche.

Alla fine della coltura si valutava la reattività tumorale tramite rilascio di interferone gamma (IFN- γ). I linfociti T modificati con il CAR pMND-kappa_{LC} secretavano IFN- γ dopo la co-coltura con cellule Daudi kappa+ (esprimenti kappa_{LC}). Al contrario la co-coltura di linfociti T modificati con CAR pMND-kappa_{LC} con cellule HDLM-2 kappa-negative dava luogo a un rilascio di IFN- γ paragonabile alla quantità osservata quando si coltivavano i linfociti T da soli. Il rilascio di IFN- γ si determinava con l'ausilio di corredi per ELISA dopo 24 ore di co-coltura con cellule Daudi kappa-positive o cellule HDLM-2 kappa-negative (figura 7).

ESEMPIO 7

FUNZIONE ANTITUMORALE DI LINFOCITI T CON CAR

Si determinava la funzione antitumorale di linfociti T con CAR sottoposti a ingegneria per esprimere un CAR pMND-kappa_{LC}. Si raccoglievano cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC) da donatori normali e si attivavano via coltivazione con anticorpi specifici per CD3 e CD28 (da Miltenyi Biotec) in mezzo contenente

IL-2 (da CellGenix). Dopo l'attivazione si trasducevano le colture di PBMC con vettori lentivirali o si lasciavano senza trattamento. Si mantenevano le colture per permettere l'attecchimento ed espansione dei linfociti T (7-10 giorni). Al momento della raccolta le colture comprendevano linfociti T che si erano espansi per circa 2 ragioni logaritmiche.

Prese 2×10^6 cellule Daudi etichettate con un gene di luciferasi di lucciola, si instauravano in topi NOD scid con knockout della catena gamma del recettore della IL-2 (NSG) via iniezione intravenosa. Tre, sei e nove giorni dopo avere iniettato cellule tumorali nei topi si trasferivano adottivamente 1×10^7 linfociti T modificati con CAR pMND-kappa_{LC} nei topi e si monitorava la crescita tumorale tramite bioluminescenza con l'ausilio di un sistema Xenogen-IVIS Imaging. Il carico tumorale era ridotto in topi con somministrazione di linfociti T modificati con CAR in confronto con il carico tumorale nei topi non trattati (figura 8).

ESEMPIO 8

GENERAZIONE DI UN PRODOTTO FARMACOLOGICO CON LINFOCITI T CON CAR
FUNZIONALI

Si producevano linfociti T con CAR esponenti anti-BCMA come descritto all'esempio 1 di cui sopra. Tali

linfociti T con CAR evidenziavano una rimozione tumorale specifica per antigene. I linfociti T con CAR esprimenti anti-BCMA si co-coltivavano per 4 ore con cellule K562 o con cellule K562 modificate per esprimere BCMA. Le cellule tumorali esprimenti l'antigene si etichettavano con carbossifluoresceina succinimidilestere (CFSE) e si misurava la fluorescenza via FACS. I linfociti T con CAR esprimenti anti-BCMA uccidevano cellule K562 esprimenti BCMA (figura 9A) e rilasciavano IFN- γ (figura 9B) (n = 3).

RIVENDICAZIONI

1. Vettore lentivirale comprendente un polinucleotide comprendente un promotore potenziatore del virus del sarcoma mieloproliferativo con delezione della regione di controllo negativo e sostituzione del sito di legame all'innesco dl587rev (MND) operativamente collegato a un acido nucleico codificante un recettore antigenico chimerico (CAR), in cui il CAR comprende:
 - (a) un scFv che si lega all'antigene di maturazione dei linfociti B (BCMA);
 - (b) una regione cerniera di CD8 α ;
 - (c) un dominio transmembrana di CD8 α ;
 - (d) un dominio di segnalazione co-stimolatore di CD137; e
 - (e) un dominio di segnalazione primario di CD3 ζ .
2. Vettore lentivirale secondo la rivendicazione 1, in cui il CAR comprende ulteriormente una regione distanziatrice o un peptide segnale.
3. Vettore lentivirale secondo la rivendicazione 1, in cui il lentivirus è selezionato dal gruppo consistente di: virus dell'immunodeficienza umana (HIV)-1 e HIV-2.
4. Vettore lentivirale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, comprendente una LTR

lentivirale sinistra (5'), un segnale di packaging psi (Ψ), un tratto di polipurina centrale / lembo di DNA (cPPT/FLAP), un elemento di esportazione retrovirale; un promotore MND operativamente collegato al CAR secondo la rivendicazione 1; e una LTR lentivirale destra (3').

5. Vettore lentivirale secondo la rivendicazione 4, comprendente ulteriormente:
 - a) una sequenza di poliadenilazione eterologa;
 - b) una sequenza di poliadenilazione eterologa che è una sequenza di poliadenilazione dell'ormone della crescita dei bovini o di poliadenilazione di segnale di β -globina di coniglio; o
 - c) un elemento regolatore post-trascrizionale del virus dell'epatite B (HPRE) o un elemento regolatore post-trascrizionale della marmotta americana (WPRE).

6. Vettore lentivirale secondo una qualsiasi tra la rivendicazione 4 e la rivendicazione 5, in cui:
 - (a) il promotore della LTR 5' è sostituito da un promotore eterologo;
 - (b) il promotore della LTR 5' è sostituito da un promotore del citomegalovirus (CMV), un promotore del virus del sarcoma di Rous (RSV) o un promotore del virus 40 delle scimmie

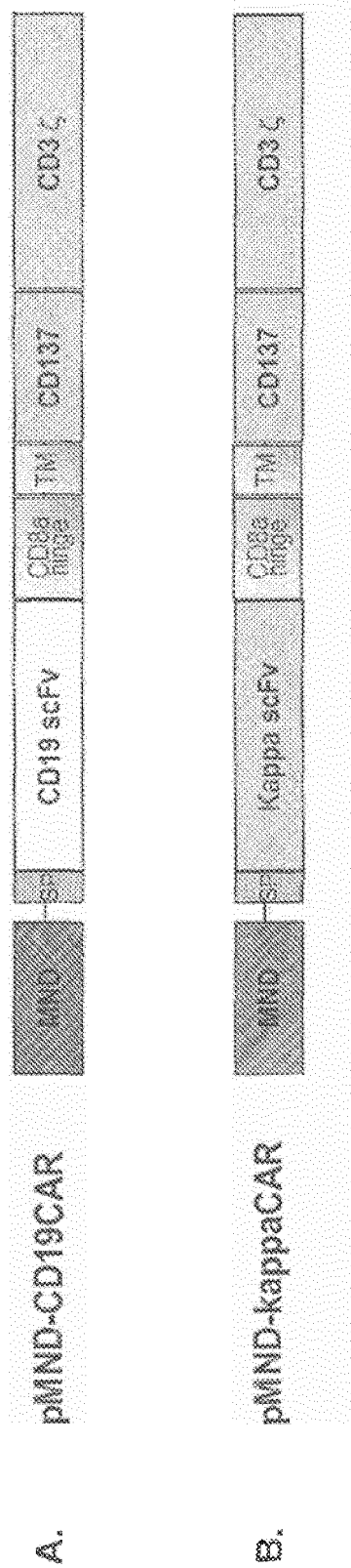
(SV40);

- (c) la LTR 3' comprende una o più modifiche;
 - (d) la LTR 3' comprende una o più delezioni; o
 - (e) la LTR 3' è una LTR autoinattivante (SIN).
7. Cellula effettrice immunitaria comprendente il vettore lentivirale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6.
 8. Cellula effettrice immunitaria secondo la rivendicazione 7, in cui la cellula effettrice immunitaria è un linfocita T.
 9. Cellula effettrice immunitaria secondo la rivendicazione 7, in cui la cellula effettrice immunitaria è una cella natural killer (NK).
 10. Composizione comprendente la cellula effettrice immunitaria secondo la rivendicazione 8 o la rivendicazione 9 e un eccipiente fisiologicamente accettabile.
 11. Composizione secondo la rivendicazione 10 per l'uso in un metodo per il trattamento di un cancro in un soggetto bisognoso in tal senso.
 12. Composizione secondo la rivendicazione 10 per l'uso in un metodo per il trattamento di una malignità ematologica in un soggetto bisognoso in tal senso.
 13. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione

12, in cui la malignità ematologica è una malignità dei linfociti B.

14. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 13, in cui la malignità dei linfociti B è selezionata dal gruppo consistente di: mieloma multiplo (MM), linfoma non Hodgkin (NHL) e leucemia linfocitica cronica (CLL).
15. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 14, in cui il MM è selezionato dal gruppo consistente di: mieloma multiplo palese, mieloma multiplo latente, leucemia alle cellule del plasma, mieloma non secretorio, mieloma a IgD, mieloma osteosclerotico, plasmocitoma solitario dell'osso e plasmocitoma extramidollare.

FIG. 1



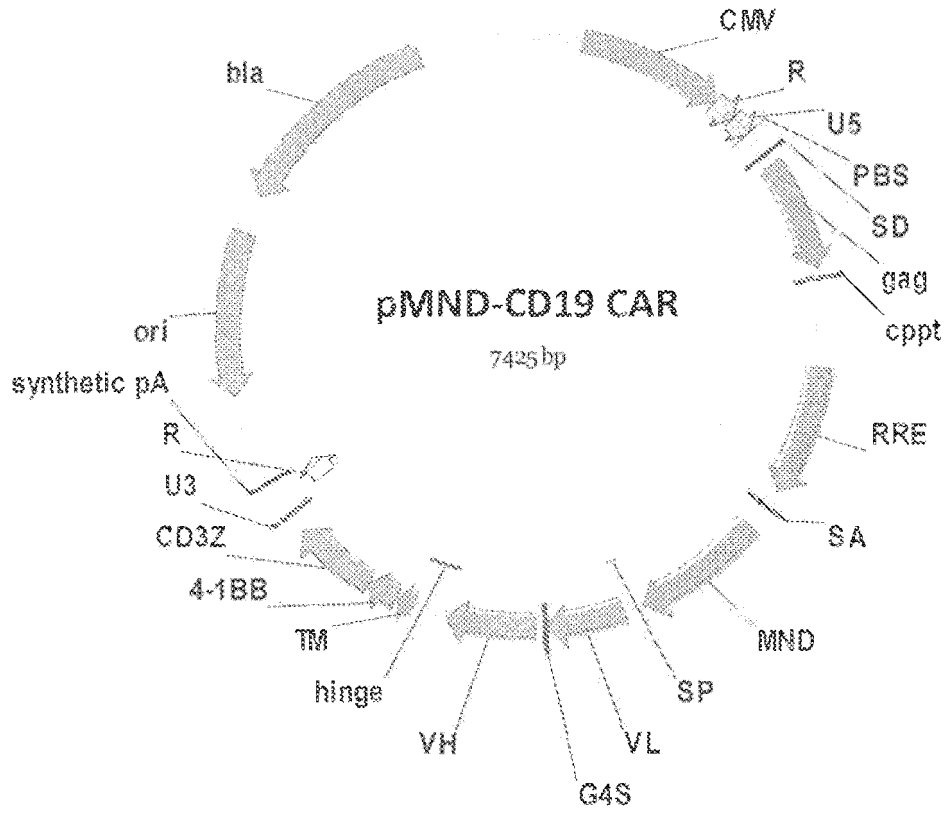


FIG. 2

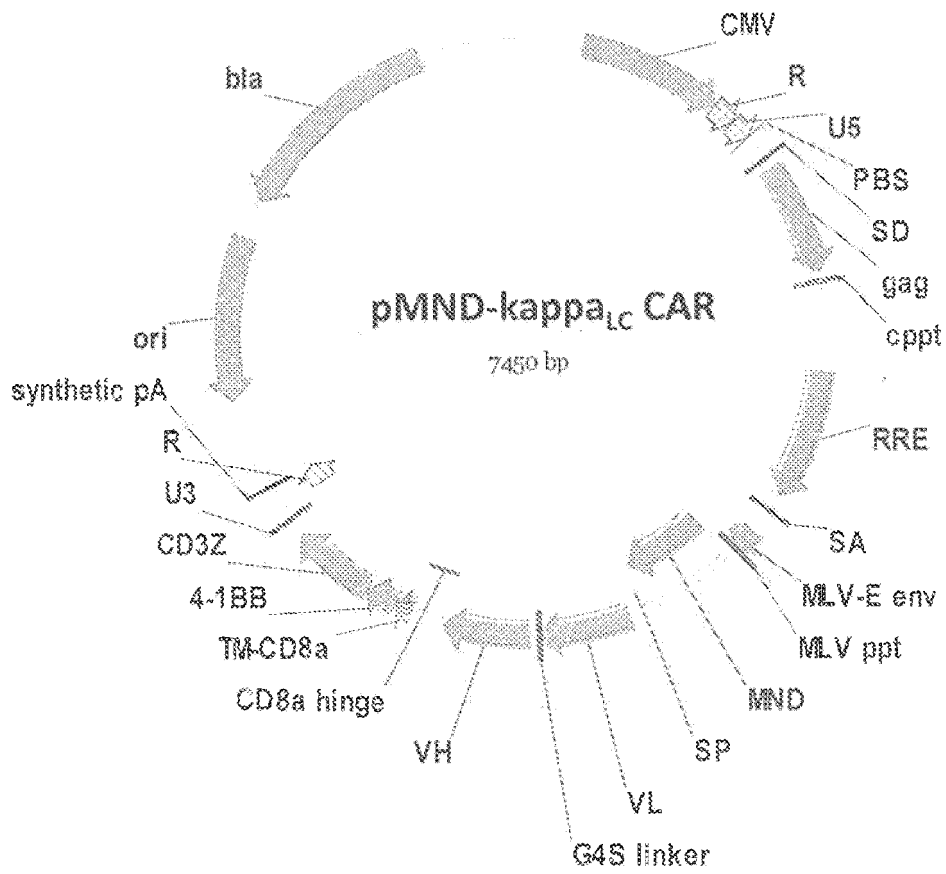


FIG. 3

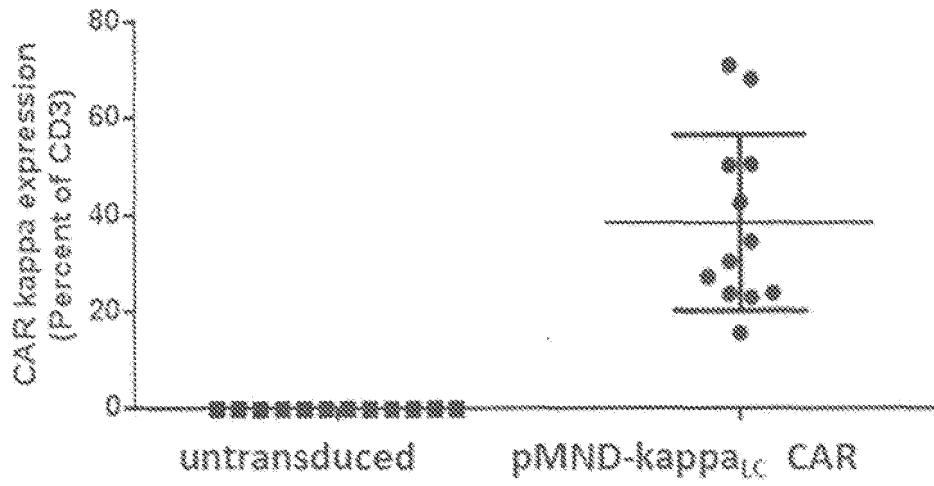


FIG. 5

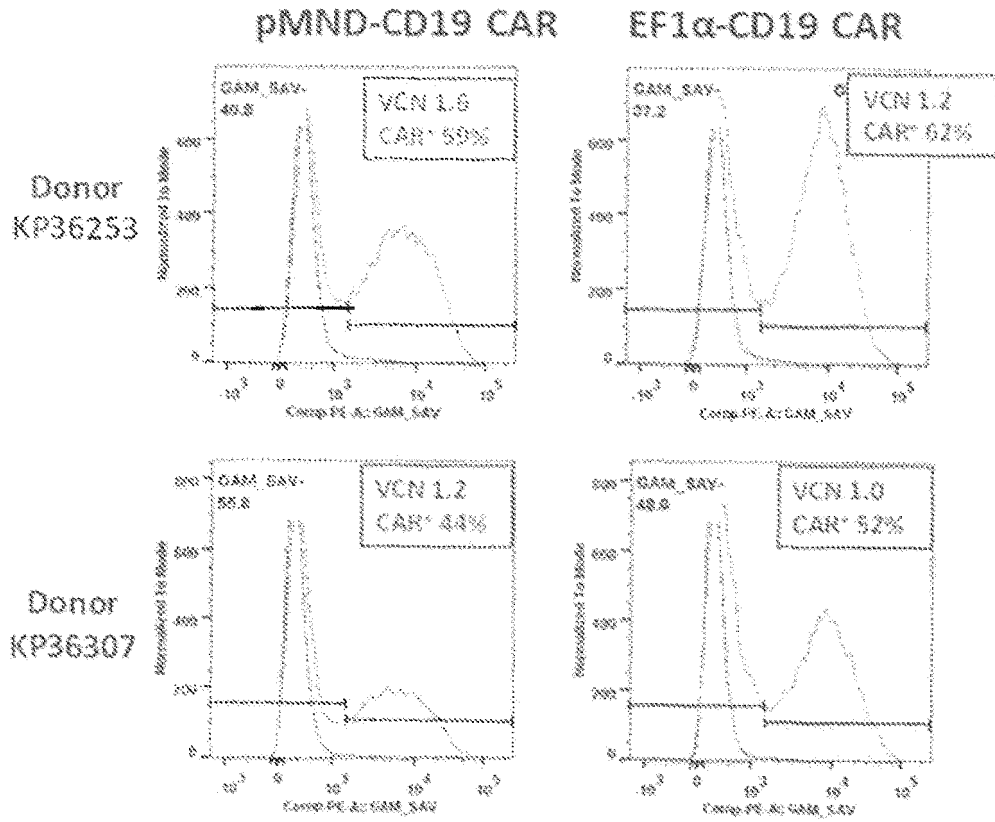


FIG. 6

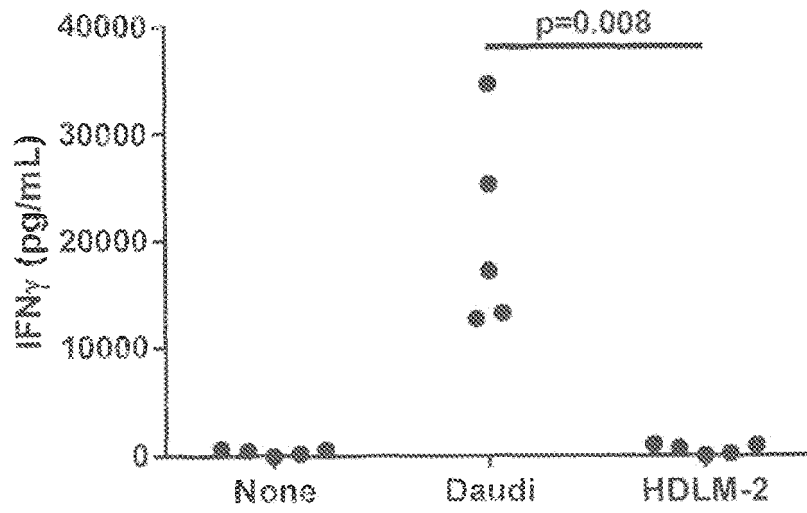


FIG. 7

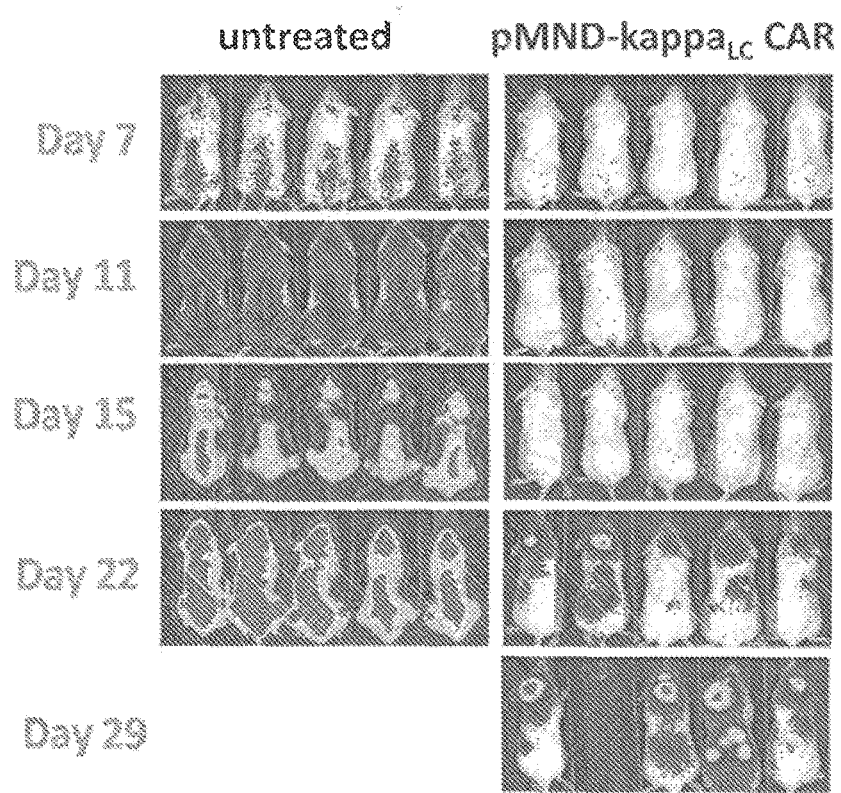


FIG. 8

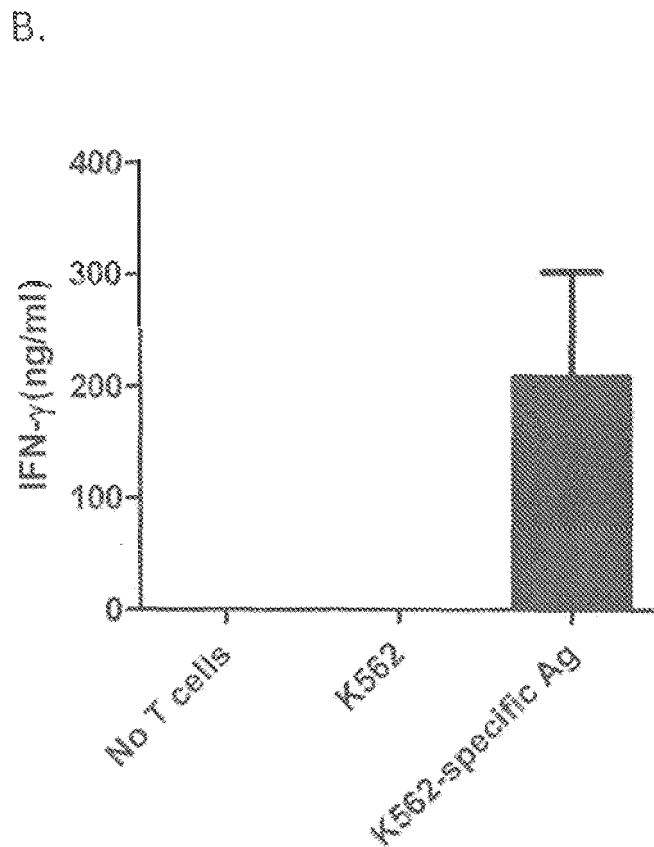
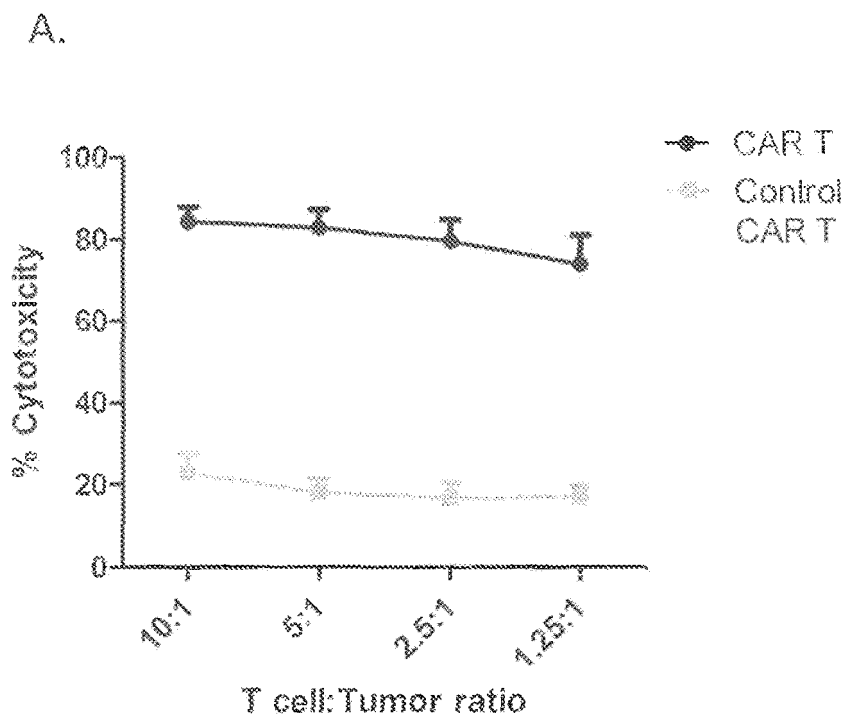


FIG. 9