

RECEPTOR ANTIGÉNICO QUIMÉRICO (CAR) CON DOMINIOS DE UNIÓN A ANTÍGENO A LA REGIÓN CONSTANTE DEL RECEPTOR DE CÉLULAS T BETA

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se relaciona con células y agentes útiles en el tratamiento de linfoma o leucemia de células T.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Las malignidades linfoides pueden dividirse a grandes rasgos en las que se derivan ya sea a partir de células T o de células B. Las malignidades de células T son un grupo clínica y biológicamente heterogéneo de trastornos, que en conjunto comprenden 10 a 20% de los linfomas no de Hodgkin y 20% de las leucemias agudas. Los subtipos histológicos más comúnmente identificados son linfoma de células T periféricas no especificado de otro modo (PTCL-NOS), linfoma
- 15 angioinmunoblástico de células T (AITL) y linfoma anaplásico de células grandes (ALCL). De todas las Leucemias Linfoblásticas Agudas (ALL), un 20% son de un fenotipo de células T.

- Estos padecimientos típicamente se comportan agresivamente en comparación, por
- 20 ejemplo, con malignidades de células B, con una supervivencia estimada a 5 años de sólo 30%. En el caso del linfoma de células T, se asocian con una alta proporción de pacientes que cursan con enfermedad diseminada, puntuación desfavorable en el Indicador Internacional de Pronóstico (IPI) y prevalencia de enfermedad extranodal. La quimioterapia sola usualmente no es efectiva y menos de 30% de los pacientes se
- 25 curan con los tratamientos actuales.

- Además, a diferencia de las malignidades de células B, donde las inmunoterapias tales como el anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab tienen resultados clínicos dramáticamente mejorados, actualmente no hay un inmunoterapéutico equivalente
- 30 efectivo y mínimamente tóxico disponible para el tratamiento de malignidades de células T. Una importante dificultad en el desarrollo de la inmunoterapia para trastornos de células T es la considerable superposición en la expresión de marcadores de células T clonales y normales, sin un solo antígeno claramente capaz de identificar células clonales (malignas).

- 35 Existe el mismo problema cuando se enfoca un antígeno pan-células B para tratar una malignidad de células B. Sin embargo, en este caso, el agotamiento

concomitante del compartimiento de células B tiene como resultado una inmunodepresión relativamente menor, la cual se tolera fácilmente por la mayor parte de los pacientes. Además, en las terapias que tienen como resultado que un agotamiento particularmente a largo plazo del compartimiento B normal, su pérdida puede anularse en gran medida por la administración de la inmunoglobulina acumulada. La situación es completamente diferente cuando se apunta a malignidades de células T. Aquí, el agotamiento concomitante del compartimiento de células T conduce a inmunodepresión severa y toxicidad severa. Además, no hay una forma satisfactoria para mitigar la pérdida del compartimiento de células T.

La toxicidad se ilustra en parte por los efectos clínicos del anticuerpo monoclonal agente terapéutico Alemtuzumab. Este agente lisa las células que expresan CD52 y tiene cierta eficacia en las malignidades de células T. La utilidad de este agente se limita en gran medida por una profunda inmunodeficiencia celular, debida en gran medida al agotamiento de células T, con un riesgo de infección marcadamente elevado.

De esta manera, existe la necesidad de un nuevo método para un tratamiento orientado de malignidades de células T, que no se asocie con las desventajas anteriores.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Diagrama del complejo receptor de células T $\alpha\beta$ /CD3. El receptor de células T se forma a partir de 6 diferentes cadenas de proteínas que deben ensamblarse en el retículo endoplásmico para expresarse en la superficie celular. Las cuatro proteínas del complejo CD3 (CD3 ζ , CD3 γ , CD3 ϵ y CD3 δ) envuelven el receptor de células T (TCR). El TCR infunde al complejo de especificidad de un antígeno particular, y se compone de dos cadenas: TCR α y TCR β . Cada cadena de TCR tiene un componente variable distal a la membrana y un componente constante proximal a la membrana. Casi todos los linfomas de células T y muchas leucemias de células T expresan el complejo TCR/CD3.

Figura 2: Segregación de la región constante del receptor β de células T (TRBC) 1 y TRBC2 durante la reestructuración del receptor de células T. Cada cadena beta de TCR se forma a partir de la recombinación genómica de una variable beta particular (V), diversidad (D), unión (J) y regiones constantes (TRBC). El genoma humano contiene dos loci TRBC muy similares y funcionalmente

equivalentes, conocidos como TRBC1 y TRBC2. Durante la reestructuración génica del TCR, una región J se recombina con TRBC1 o TRBC2. Esta reestructuración es permanente. Las células T expresan muchas copias de un solo TCR en su superficie y, por tanto, cada célula T expresará un TCR cuya región constante de cadena β se codifica por TRBC1 o TRBC2.

Figura 3: Alineamiento de las TRBC1 y TRBC2 humanas a nivel de aminoácidos. La cadena constante de TCR β , codificada por TRBC1 y TRBC2, difiere en sólo 4 diferencias de aminoácidos: K / N en la posición 3 de la TRBC, N / K en la posición 4 de la TRBC, F / Y en la posición 36 de la TRBC, V / E en la posición 135 de la TRBC.

Figura 4: Demostración definitiva de que el anticuerpo JOVI-1 se une a TRBC1 pero no a TRBC2. La ingeniería genética de células se utilizó para demostrar definitivamente que el anticuerpo monoclonal JOVI-1 reconoce la variante TRBC1 de la cadena constante de TCR β . Se generó un casete retroviral tricistrónico. El mismo codificaba ambas cadenas TCR α y TCR β de un TCR humano que reconoce el antígeno menor de histocompatibilidad HA1, en conjunto con el CD34 humano truncado como gen marcador conveniente. El HA1 TCR es TRBC2 en forma nativa. Se generó un segundo casete retroviral que era idéntico al primero, excepto que los 4 residuos en la región constante de TCR β , los cuales diferencian a TRBC1 de TRBC2, se cambiaron a aquellos codificados por TRBC1. Células T Jurkat, que tenían sus cadenas TCR α y TCR β eliminadas, se transdujeron con cada vector. Estas células se tiñeron con un anticuerpo pan-TCR/CD3 o el monoclonal JOVI-1 conjugado, en conjunto con anticuerpos contra CD34, y se analizaron en un citómetro de flujo. La hilera superior demuestra la tinción con un anticuerpo pan-TCR/CD3 v CD34 (marcador de transducción), la hilera inferior demuestra tinción con JOVI-1 vs CD34. Las células transducidas demuestran tinción TCR/CD3 similar, pero sólo las células TRBC1 +ve se tiñen con JOVI-1. Por tanto, JOVI-1 es específico para TRBC1 y, además, es posible utilizar un anticuerpo para distinguir a TRBC1 y 2 TCR.

FIGURA 5: El mAb JOVI-1 diferencia a TRBC1 de TRBC2 al reconocer los residuos 3 y 4 de la TRBC. Para determinar precisamente cómo JOVI-1 discrimina a TRBC1 de TRBC2, la construcción HA1 TCR TRBC2, detallada arriba, se mutó para elaborar dos híbridos TRBC1/2. Una variante adicional se generó a fin de que sólo los residuos 3 y 4 de la cadena constante de TCR β se cambiaran, a partir de

aquellos de TRBC2, a los encontrados en TRBC1. Se elaboró una variante adicional donde sólo el residuo 36 se cambió, a partir del encontrado en TRBC2, a TRBC1. Células T Jurkat, con eliminación de TCR, se transdujeron con estas nuevas construcciones. Las células Jurkat originales, transducidas con TRBC2 y TRBC1, descritas en la Figura 4, se utilizaron como controles. Las células T Jurkat se tiñeron con JOVI-1 y se analizaron con un citómetro de flujo. La tinción de JOVI-1 se superpone a la de células T Jurkat con eliminación de TCR sin transducir. JOVI-1 tiñó células Jurkat que expresaban TRBC1 TCR pero no TRBC2 TCR. JOVI-1 tiñó el híbrido TRBC1/2, donde sólo los residuos 3 y 4 de TRBC fueron los de TRBC1. JOVI-1 no tiñó células T Jurkat donde sólo el residuo 36 de TRBC fue el de TRBC1.

FIGURA 6: Ejemplo de la expresión de TRBC1 a partir de células T de donadores normales. Células mononucleares de sangre periférica de donadores normales se tiñeron con anticuerpos contra CD3, CD4, CD8 y JOVI-1 y se analizaron por citometría de flujo. Las poblaciones de células T CD4+ y CD8+ se muestran en el panel superior. Cada una de estas poblaciones se modula y la dispersión frontal vs JOVI-1 staining se muestra en los ejes Y y X, respectivamente. Estos datos muestran que los compartimientos CD4+ y CD8+ contienen células que son TRBC1 +ve y -ve. Estos son datos representativos de un donador.

FIGURA 7: Células T TRBC1+ en varios donadores normales. Diez donadores normales se sangraron y las células mononucleares de sangre periférica se tiñeron como se describe en la Figura 4 arriba. Los datos agregados de la proporción de células T TRBC1 en ambos compartimientos, CD4 y CD8, se muestran en una gráfica de barras en conjunto con la mediana y el intervalo. Todos los donadores tenían compartimientos TRBC1+ y TRBC1-. Mediana porcentual de células TRBC1+ = 36%.

FIGURA 8: Líneas celulares derivadas de malignidades de células T, teñidas con JOVI-1. Varias líneas celulares se han derivado a partir de malignidades de células T. Muchas de estas líneas celulares aún expresan el TCR. Se seleccionaron células Jurkat (una línea celular de leucemia de células T), HPB-ALL (otra línea celular de leucemia de células T) y HD-Mar-2 (una línea celular de linfoma de células T) para su estudio. Al teñir estas líneas celulares con un anticuerpo pan-TCR/CD3, se tuvo la capacidad de demostrar que las tres expresaban el TCR (paneles izquierdos, tinción superpuesta a tinción de control de isotipo). Después, al teñir con JOVI-1, se tuvo la capacidad de determinar que estas líneas de células T son

negativas o positivas a TRBC1. Sólo las células Jurkat (TRBC1+), y no las células HPB-ALL o HD-Mar-2 (TRBC2+), se tiñen con JOVI-1, lo que soporta la expresión exclusiva de TRBC1 o 2.

5 **FIGURA 9: Eliminación selectiva de células T TRBC1 con mAb JOVI-1.** Células T Jurkat de tipo silvestre (CD34-, TRBC1+) se mezclaron con células T Jurkat con eliminación de TCR $\alpha\beta$ transducidas con TRBC2, coexpresado con el gen marcador CD34 (CD34+TRBC2+). Estas células se incubaron con JOVI-1 solo, o se incubaron con JOVI-1 y complemento por 1 hora. Las células se lavaron y tiñeron para CD34,
10 Anexina V y 7-AAD. Las células se analizaron por citometría de flujo. A continuación se muestra la expresión de CD34 en la población viva, como se define por la población negativa para Anexina-V y débil para 71AAD. (a) JOVI-1 solo; (b) JOVI-1 con complemento. Se observa eliminación selectiva de células T TRBC1 (CD34-).

15 **FIGURA 10: Las células T, específicas para el Virus de Epstein Barr (EBV) policlonal, pueden dividirse en dos poblaciones TRBC1/2 aproximadamente iguales.** Al utilizar métodos bien establecidos, los inventores expandieron selectivamente células T específicas de EBV a partir de la sangre periférica de un donador normal. La línea subsecuente tenía un alto grado de selectividad contra
20 células B infectadas con EBV autólogo (auto LCL), sin actividad contra células T infectadas con EBV alogénico (alo LCL), y sin actividad NK inespecífica (cuando se mide al probarse contra células K562). Esta línea es representativa de la inmunidad para EBV del donador. (b) Cuando se tiñeron con JOVI-1, estas células T se tiparon de modo aproximadamente igual para TRBC1 y TRBC2.

25

FIGURA 11: Secuencia acotada de VH y VL de JOVI-1. Las regiones hipervariables se subrayan y se ponen en negras.

FIGURA 12: Demostración de que un linfoma de células T periféricas se restringe en TRBC, pero no las células T circulantes normales. Se extrajeron
30 células T de sangre periférica de un paciente con células circulantes de linfoma de células T. Las células mononucleares periféricas se aislaron y tiñeron con un panel de anticuerpos, incluyendo CD5, TCR y JOVI-1. Las células T normales y malignas pudieron diferenciarse en citometría de flujo por la intensidad de expresión de CD5.
35 El brillo de CD5 (células T normales) tuvo poblaciones de TRBC1 y 2 aproximadamente iguales. Las poblaciones intermedias y débiles para CD5 (el tumor) fueron en su totalidad positivas a TRBC2. Si este paciente tuviera una terapia

dirigida a TRBC2, el linfoma podría erradicarse y aproximadamente la mitad de sus células T podría reservarse.

FIGURA 13: Demostración de que el VH y VL, derivados de JOVI-1, fueron correctos y de que pueden plegarse como fragmento variable de cadena sencilla. Sobrenadante de hibridoma original, anticuerpo JOVI-1 recombinante y scFv-Fc generados a partir de células 293T transfectadas, se utilizaron para teñir una serie de líneas celulares: células Jurkat con eliminación de TCR, células Jurkat de tipo silvestre, células Jurkat con eliminación de TCR transducidas con un TRBC1 TCR en un vector que coexpresa eBFP2, células Jurkat con eliminación de TCR transducidas con un TRBD2 TCR en un vector que coexpresa eBFP2. La tinción se analizó por citometría de flujo. Tanto el anticuerpo recombinante como el scFv se unieron a células que expresaban TRBC2.

FIGURA 14: CAR basados en JOVI-1 en formatos diferentes. Los CAR típicamente se comprenden de un dominio de unión, un espaciador, un dominio transmembranal y un dominio de señalización intracelular. En este estudio se generaron CAR que se comprenden del scFv de JOVI-1, un espaciador derivado del tallo de CD8, el dominio bisagra-CH2-CH3 de IgG1 humana con mutaciones que remueven la unión de FcR, o un espaciador derivado de IgG1 humana.

FIGURA 15: Función del CAR basado en JOVI-1. Células T de sangre periférica de donadores normales se transdujeron con los diferentes CAR, descritos arriba. Las células T también se transdujeron con un CAR específico de CD19 como control. Estas células T luego se desafiaron con células objetivo: células Jurkat, con eliminación de TCR, células Jurkat de tipo silvestre y células Raji (una línea de linfoma de células B CD19+). Se muestran datos de liberación de cromo de las efectoras contra diferentes objetivos. Las células T con CAR de JOVI-1 eliminan las células Jurkat, pero no células Raji o células Jurkat con TCR eliminado.

FIGURA 16: Autodepuración de cultivos de células T con CAR de JOVI-1. Dado que las células T se comprenden de cifras aproximadamente iguales de células T que son positivas a TRBC1 o TRBC2, es posible que, después de la introducción de los CAR, pueda presentarse cierta cantidad de “fratricidio” o autodepuración del cultivo. Se demostró que este fue el caso. En este ejemplo, se tiñeron células T con CAR después de la transducción y se analizaron por citometría de flujo. Al comparar

la transducción versus la transducción simulada, puede observarse que la población de células T pierde células T positivas a TRBC1.

Figura 17: Investigación de la clonalidad de leucemia granular grande de células T (T-LGL) – Paciente A

Figura 18: Investigación de la clonalidad de leucemia granular grande de células T (T-LGL) – Paciente B

Figura 19: Investigación de la clonalidad de leucemia granular grande de células T (T-LGL) – Paciente C

Figura 20: Investigación de la clonalidad del linfoma policlonal de células T (PCTL) – Paciente D

Figura 21: Estrategias de selección de fagos para péptidos TRBC. A) Dos rondas de selecciones de expresión en fagos en fase sólida sobre péptidos TRBC directa o indirectamente inmovilizados en una superficie. B) Tres rondas de selecciones de expresión en fagos de fase en solución sobre péptidos TRBC biotinilados.

Figura 22: Análisis de producciones totales de fagos policlones a partir de selecciones de expresión en fagos de péptidos TRBC. Ensayo de unión de TRF al utilizar fagos policlones a partir de selecciones en fase sólida llevadas a cabo sobre péptidos TRBC inmovilizados directamente como conjugados BSA/OA (A), selecciones en fase sólida sobre péptidos TRBC inmovilizados en estreptoavidina/neutravidina (B) y a partir de selecciones en fase en solución (C).

Figura 23: Representación esquemática del vector pSANG10-3F. El gen que codifica el anticuerpo de cadena sencilla (scFv) se clona en el sitio NcoI/NotI corriente abajo del promotor T7 y la secuencia líder pelB (para traslocación periplásmica). El vector también contiene un marcaje C-terminal de seis histidinas (His6) para su purificación y la detección de marcaje tri-FLAG.

Figura 24: Análisis selectivo primario para agentes de unión específicos de TRBC1 y TRBC2. Unión de 94 scFvs de selecciones de TRBC1 (A) y TRBC2 (B) a TRBC1 y TRBC2 biotinilados (0.5 µg/ml) inmovilizados en placas de 96 pozos Nunc

Maxisorp™ recubiertas con neutravidina (10 µg/ml). La unión de scFv a los péptidos inmovilizados se detectó al utilizar un anticuerpo anti-FLAG conjugado a europio.

Figura 25: Unión de sueros de anticuerpos policlonales de conejo #13174 inmunizado con TRBC1 contra los péptidos TRBC1 y TRBC2. (A) Después de la 3ª inmunización. (B) Después de la 3ª inmunización y purificación de anticuerpos específicos para TRBC1.

Figura 26: Unión de sueros de anticuerpos policlonales de conejo #17363 inmunizado con el péptido TRBC2 contra los péptidos TRBC1 y TRBC2. (A) Después de la 3ª inmunización. (B) Después de la 3ª inmunización y purificación de anticuerpos específicos para TRBC2.

Figura 27: Unión de sueros de anticuerpos policlonales de conejo #17364 inmunizado con el péptido TRBC2 contra los péptidos TRBC1 y TRBC2. (A) Después de la 3ª inmunización. (B) Después de la 3ª inmunización y purificación de anticuerpos específicos para TRBC2.

SUMARIO DE LOS ASPECTOS DE LA INVENCION

Los presentes inventores han ideado un método por el cual es posible agotar las células T malignas en un sujeto, sin afectar una proporción significativa de células T sanas. En particular, han desarrollado receptores antigénicos quiméricos (CAR) específicos de TRBC1 y TRBC2, para su uso en el tratamiento de malignidades de células T.

De esta manera, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un receptor antigénico quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígenos, el cual se une selectivamente a la región constante del TCR beta 1 (TRBC1) o TRBC2.

En una primera modalidad del primer aspecto de la invención, se proporciona un CAR que se une selectivamente a TRBC1. En esta modalidad, el CAR puede comprender un dominio de unión a antígenos que tiene una cadena pesada variable (VH) y una cadena ligera variable (VL), las cuales comprenden las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

CDR1 de VH: SEQ ID No. 7;

CDR2 de VH: SEQ ID No. 8;

CDR3 de VH: SEQ ID No. 9;

CDR1 de VL: SEQ ID No. 10;
CDR2 de VL: SEQ ID No. 11; y
CDR3 de VL: SEQ ID No. 12.

- 5 El CAR puede comprender un dominio de unión a antígenos, el cual comprende una cadena pesada variable (VH) que tiene la secuencia mostrada como SEQ ID No. 1, y una cadena ligera variable (VL) que tiene la secuencia mostrada como SEQ ID No. 2.

- 10 El CAR puede comprender un dominio de unión a antígenos, el cual comprende un scFv que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 3.

El CAR puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID No. 33, 34 y 35.

- 15 El CAR puede comprender una CDR3 de VH y/o una CDR3 de VL de entre aquellas listadas en la Tabla 1.

El CAR puede comprender un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, el cual comprende:

- 20 (i) la CDR3 de cadena pesada y/o la CDR3 de cadena ligera;
(ii) la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y/o la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera; o
(iii) La cadena pesada variable (VH) y/o la cadena ligera variable (VL);
a partir de uno de los scFv mostrados como SEQ ID No. 13 a 22.

25

En una segunda modalidad del primer aspecto de la invención, se proporciona un CAR que se une selectivamente a TRBC2.

- 30 En relación con esta modalidad, el CAR puede comprender una CDR3 de VH y/o una CDR3 de VL de entre aquellas listadas en la Tabla 2.

El CAR puede comprender un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, el cual comprende:

- 35 (i) la CDR3 de cadena pesada y/o la CDR3 de cadena ligera;
(ii) la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y/o la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera; o
(iii) La cadena pesada variable (VH) y/o la cadena ligera variable (VL);

a partir de uno de los scFv mostrados como SEQ ID No. 23 a 32.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

5

En un tercer aspecto, se proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

En un cuarto aspecto, se proporciona una célula que comprende un CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención. La célula puede ser una célula inmune citolítica, tal como una célula T o célula asesina natural (NK).

10

En un quinto aspecto, se proporciona un método para producir una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención, el cual comprende la etapa de transducir o transfectar una célula con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, o un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención.

15

En un sexto aspecto, se proporciona una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención, para su uso en un método para tratar un linfoma o leucemia de células T en un sujeto, el cual comprende la etapa de administrar la célula que comprende el CAR selectivo para TCRB1 o TCRB2 al sujeto, para dar lugar al agotamiento selectivo de las células T malignas, en conjunto con células T normales que expresan la misma TRBC que las células T malignas, pero no para dar lugar al agotamiento de células T normales que expresan la TRBC no expresada por las células T malignas.

20

25

El método también puede comprender la etapa de investigar la región constante del TCR beta (TCRB) de una célula T maligna del sujeto, para determinar si expresa TRBC1 o TRBC2.

30

También se proporciona un método para tratar un linfoma o leucemia de células T en un sujeto, el cual comprende la etapa de administrar un agente selectivo para TCRB1 o TCRB2 al sujeto, en donde el agente da lugar al agotamiento selectivo de las células T malignas, en conjunto con células T normales que expresan la misma TRBC que las células T malignas, pero no da lugar al agotamiento de células T normales que expresan la TRBC no expresada por las células T malignas.

35

En una primera modalidad de este aspecto de la invención, el agente es un agente selectivo para TCRB1. En una segunda modalidad de este aspecto de la invención, el agente es un agente selectivo para TCRB2.

5

El método también puede comprender la etapa de investigar la región constante del TCR beta (TRBC) de una célula T maligna, para determinar si expresa TRBC1 o TRBC2, antes de la etapa de administración.

10 El agente puede ser un anticuerpo monoclonal de agotamiento, o un fragmento del mismo. El agente puede ser un anticuerpo conjugado, el cual puede comprender una entidad quimioterapéutica.

El agente puede ser un acoplador biespecífico de células T. El agente puede ser una
15 célula T que expresa receptores antigénicos quiméricos (CAR). El CAR puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID No. 33, 34 y 35.

El agente puede comprender el anticuerpo JOVI-1, o un fragmento funcional del
20 mismo.

El agente puede comprender un anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, que tiene una cadena pesada variable (VH) y una cadena ligera variable (VL), las cuales comprenden las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

25 CDR1 de VH: SEQ ID No. 7;

CDR2 de VH: SEQ ID No. 8;

CDR3 de VH: SEQ ID No. 9;

CDR1 de VL: SEQ ID No. 10;

CDR2 de VL: SEQ ID No. 11; y

30 CDR3 de VL: SEQ ID No. 12.

El agente puede comprender un anticuerpo, o fragmento funcional del mismo, el cual comprende una cadena pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 1, y una cadena ligera variable (VL) que tiene la
35 secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 2.

El agente puede comprender un ScFv que tiene la secuencia de aminoácidos

mostrada como SEQ ID No. 3. El agente puede proporcionarse como composición farmacéutica.

El linfoma o leucemia de células T puede seleccionarse a partir de linfoma de células
5 T periféricas no especificado de otro modo (PTCL-NOS), linfoma angioinmunoblástico de células T (AITL), linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), linfoma de células T asociado a enteropatía (EATL), linfoma hepatoesplénico de células T (HSTL), linfoma extranodal de células T / NK de tipo nasal, linfoma cutáneo de células T, ALCL cutáneo primario, leucemia prolinfocítica de células T y
10 leucemia linfoblástica aguda de células T.

La presente invención también proporciona un agente para su uso en el tratamiento de un linfoma o leucemia de células T, de acuerdo con el método.

15 La presente invención también proporciona un equipo que comprende un agente, para su uso como se define arriba.

La presente invención también proporciona el uso de un agente en la producción de un medicamento para el tratamiento de un linfoma o leucemia de células T, de
20 acuerdo con el método mencionado anterior.

La presente invención también proporciona un método para diagnosticar un linfoma o leucemia de células T en un sujeto, el cual comprende la etapa de determinar el porcentaje de células T totales, en una muestra, las cuales son positivas a TRBC1 o
25 TRBC2.

Un porcentaje de células T positivas a TRBC1 o TRBC2, el cual es mayor a aproximadamente 80%, puede indicar la presencia de un linfoma o leucemia de células T.
30

La muestra puede ser una muestra de sangre periférica o una biopsia.

El agente que se une a células T totales puede unirse a CD3.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona agentes, tales como receptores antigénicos quiméricos (CAR), los cuales se unen selectivamente a TRBC1 o TRBC2. Estos

agentes son útiles en métodos para tratar un linfoma o leucemia de células T en un sujeto. Las malignidades de células T son clonales, de modo que expresan TRBC1 o TRBC2. Al administrar un agente selectivo para TCRB1 o TCRB2 al sujeto, el agente da lugar al agotamiento selectivo de las células T malignas, en conjunto con células
5 T normales que expresan la misma TRBC que las células T malignas, pero no da lugar al agotamiento de células T normales que expresan la TRBC no expresada por las células T malignas.

REGIÓN CONSTANTE DE TCR β (TRBC)

10 EL receptor de células T (TCR) se expresa en la superficie de los linfocitos T y es responsable de reconocer antígenos unidos a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Cuando el TCR se acopla con el péptido antigénico y MHC (péptido/MHC), el linfocito T se activa a través de una serie de eventos bioquímicos mediados por enzimas asociadas, correceptores, moléculas
15 adaptadoras especializadas y factores de transcripción activados o liberados.

El TCR es un heterodímero anclado a membrana enlazado a disulfuros, que consiste normalmente en las cadenas alfa (α) y beta (β) altamente variables, expresadas como parte de un complejo con las moléculas de cadena CD3 invariante. Las células
20 T que expresan este receptor se refieren como células T $\alpha:\beta$ (o $\alpha\beta$) (~95% de las células T totales). Una minoría de las células T expresan un receptor alternativo, formado por cadenas variables gamma (γ) y delta (δ), y se refieren como células T $\gamma\delta$ (~5% de las células T totales).

25 Cada cadena α y β se compone de dos dominios extracelulares: una región Variable (V) y una región Constante (C), ambas del dominio de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF) que forman láminas β antiparalelas. La región constante es proximal a la membrana celular, seguida por una región transmembranal y una cola citoplásmica corta, mientras la región variable se une al complejo péptido/MHC (ver
30 Figura 1). La región constante del TCR consiste en secuencias cortas de conexión en las cuales un residuo de cisteína forma enlaces disulfuro, lo cual forma un vínculo entre las dos cadenas.

Los dominios variables de la cadena α y cadena β del TCR tienen tres regiones
35 hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR). La región variable de la cadena β también tiene un área adicional de hipervariabilidad (HV4), sin

embargo, esta no contacta normalmente el antígeno y, por lo tanto, no se considera una CDR.

El TCR también comprende hasta cinco cadenas invariantes γ , δ , ϵ (denominadas colectivamente CD3) y ζ . Las subunidades CD3 y ζ median la señalización por TCR a través de dominios citoplásmicos específicos que interactúan con moléculas de segundos mensajeros y adaptadoras, después del reconocimiento del antígeno por parte de $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. La expresión en superficie celular del complejo del TCR se precede por el ensamble en pares de las subunidades en las cuales los dominios transmembranal y extracelular del TCR α y β , y CD3 γ y δ , cumplen con una función.

Los TCR, por lo tanto, se componen comúnmente del complejo CD3 y las cadenas α y β del TCR, los cuales a su vez se componen de las regiones variables y constantes (Figura 1).

El locus (Chr7:q34), el cual provee la región constante del TCR β (TRBC), se ha duplicado en la historia evolutiva para producir dos genes casi idénticos y funcionalmente equivalentes: *TRBC1* y *TRBC2* (Figura 2), los cuales difieren en sólo 4 aminoácidos en la proteína madura producida por cada uno (Figura 3). Cada TCR comprenderá, en una forma mutuamente exclusiva, *TRBC1* o *TRBC2* y, como tales, cada célula T $\alpha\beta$ expresará *TRBC1* o *TRBC2*, de manera mutuamente exclusiva.

Los presentes inventores han determinado que, a pesar de la similitud entre la secuencia de la *TRBC1* y la *TRBC2*, es posible discriminar entre las mismas. Los inventores también han determinado que las secuencias de aminoácidos de *TRBC1* y *TRBC2* pueden discriminarse, aunque *in situ*, en la superficie de una célula, por ejemplo, una célula T.

CÉLULAS MALIGNAS

El término 'maligno' se utiliza en la presente, de acuerdo con su significado estándar, para referirse a una célula que no se autolimita en su crecimiento, que puede ser capaz de invadir tejidos adyacentes, y que puede ser capaz de diseminarse al tejido distante. Como tal, el término 'célula T maligna' se utiliza en la presente para referirse a una célula T expandida en forma clonal, en el contexto de un linfoma o una leucemia.

El método de la presente invención implica determinar la TRBC de una célula T maligna. Esto puede realizarse al utilizar los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede determinarse por PCR, inmunotransferencia tipo Western, citometría de flujo o métodos de microscopía fluorescente.

5

Una vez que la TRBC expresada por una célula T maligna se ha determinado, el agente selectivo apropiado para TRBC1 o TRBC2 se administra al sujeto. 'Agente selectivo apropiado para TRBC' significa que, en casos donde se determina que la célula T maligna expresa TRBC1, se administra un agente selectivo para TRBC1, en tanto que, en casos donde se determina que la célula T maligna expresa TRBC2, se administra un TRBC2 agente selectivo.

10

AGENTE SELECTIVO

El agente selectivo se une a TRBC1 o TRBC2 de manera mutuamente exclusiva.

15

Como se indica arriba, cada célula T $\alpha\beta$ expresa un TCR que comprende TRBC1 o TRBC2. En un trastorno de células T clonales, tal como un linfoma o leucemia de células T, las células T malignas derivadas del mismo clon expresarán en su totalidad ya sea TRBC1 o TRBC2.

20

De esta manera, el método presente comprende la etapa de administrar un agente selectivo para TRBC1 o TRBC2 al sujeto, en donde el agente da lugar al agotamiento selectivo de las células T malignas, en conjunto con células T normales que expresan la misma TRBC que las células T malignas, pero no da lugar a un agotamiento significativo de células T normales que expresan la otra TRBC de las células T malignas.

25

Dado que el agente selectivo para TRBC no da lugar a un agotamiento significativo de las células T normales que expresan la otra TRBC de las células T malignas, no da lugar al agotamiento de todo el compartimiento de células T. La retención de una proporción del compartimiento de células T del sujeto (es decir, las células T que no expresan la misma TRBC que la célula T maligna) tiene como resultado una toxicidad reducida y una inmunodeficiencia celular y humoral reducida, lo que en consecuencia reduce el riesgo de infección.

30

35

La administración de un agente selectivo para TRBC1, de acuerdo con el método de la presente invención, puede tener como resultado un 5, 10, 20, 50, 75, 90, 95 o 99%

de agotamiento, es decir, una reducción en el número de células T que expresan TRBC1.

5 La administración de un agente selectivo para TRBC2, de acuerdo con el método de la presente invención, puede tener como resultado un 5, 10, 20, 50, 75, 90, 95 o 99% de agotamiento, es decir, una reducción en el número de células T que expresan TRBC2.

10 Un agente selectivo para TRBC1 puede unirse a TRBC1 con una afinidad por lo menos 2 veces, 4 veces, 5 veces, 7 veces o 10 veces mayor que a TRBC2. Asimismo, un agente selectivo para TRBC2 puede unirse a TRBC2 con una afinidad por lo menos 2 veces, 4 veces, 5 veces, 7 veces o 10 veces mayor que a TRBC1.

15 Un agente selectivo para TRBC1 da lugar al agotamiento de una mayor proporción de células T que expresan TRBC1, en la población celular, que de células que expresan TRBC2. Por ejemplo, la relación de agotamiento de células T que expresan TRBC1 a células que expresan TRBC2 puede ser de por lo menos 60%:40%, 70%:30%, 80%:20%, 90%:10% o 95%:5%. Asimismo, un agente selectivo para TRBC2 da lugar al agotamiento de una mayor proporción de células T que expresan TRBC2, en la población celular, que de células que expresan TRBC1. Por ejemplo, la relación de agotamiento de células T que expresan TRBC2 a células que expresan TRBC1 puede ser de por lo menos 60%:40%, 70%:30%, 80%:20%, 90%:10% o 95%:5%.

25 Al utilizar el método de la invención, se eliminan las células T malignas en un sujeto sin afectar una proporción significativa de células T sanas. Por “una proporción significativa” se quiere decir que una proporción suficiente de células T, que expresan la TRBC diferente a la de las células T malignas, sobrevive con el fin de mantener la función de las células T en el sujeto. El agente puede dar lugar al agotamiento de menos de 20%, 15%, 10% o 5% de la población de células T que expresan la otra TCRB.

El agente selectivo puede ser selectivo para TRBC1 o TRBC2 dado que discrimina los residuos como se lista a continuación:

- 35
- (i) N de K en la posición 3 de la TRBC;
 - (ii) K de N en la posición 3 de la TRBC;
 - (iii) K de N en la posición 4 de la TRBC;

- (iv) N de K en la posición 4 de la TRBC;
- (v) F de Y en la posición 36 de la TRBC;
- (vi) Y de F en la posición 36 de la TRBC;
- (vii) V de E en la posición 135 de la TRBC; y/o
- 5 (viii) E de V en la posición 135 de la TRBC.

El agente selectivo puede discriminar cualquier combinación de las diferencias anteriores.

10 ANTICUERPO

El agente utilizado en el método de la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal de agotamiento (mAb), o un fragmento funcional del mismo, o un mimético de anticuerpo.

- 15 El término 'anticuerpo de agotamiento' se utiliza en sentido convencional para relacionarse con un anticuerpo que se une a un antígeno, presente en una célula objetivo T, y media la muerte de la célula T objetivo. La administración de un anticuerpo de agotamiento a un sujeto, por lo tanto, tiene como resultado una reducción/disminución en el número de células que expresan el antígeno objetivo
- 20 dentro del sujeto.

- Como se utiliza en la presente, "anticuerpo" significa un polipéptido que tiene un sitio de unión a antígenos, el cual comprende por lo menos una región determinante de la complementariedad, CDR. El anticuerpo puede comprender 3 CDR y tener un sitio
- 25 de unión a antígenos el cual es equivalente al de un anticuerpo de dominios (dAb). El anticuerpo puede comprender 6 CDR y tener un sitio de unión a antígenos el cual es equivalente al de una molécula de anticuerpo clásico. El resto del polipéptido puede ser cualquier secuencia que proporcione un andamiaje adecuado para el sitio de unión a antígenos, y lo muestre de manera apropiada para que se una al antígeno. El
- 30 anticuerpo puede ser una molécula de inmunoglobulina completa, o parte de la misma, tal como un fragmento Fab, F(ab)'₂, Fv, Fv de de cadena sencilla (ScFv) o un nanoanticuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo bifuncional. El anticuerpo puede ser no humano, quimérico, humanizado o totalmente humano.
- 35 El anticuerpo, por lo tanto, puede ser cualquier fragmento funcional que retenga la especificidad antigénica del anticuerpo completo.

ANTICUERPOS SELECTIVOS PARA TRBC1

El agente, para su uso en el método de la presente invención, puede comprender un anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, que tiene una cadena pesada variable (VH) y una cadena ligera variable (VL), las cuales comprenden una o más de las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

CDR1 de VH: GYTFTGY (SEQ ID No. 7);

CDR2 de VH: NPYNDD (SEQ ID No. 8);

CDR3 de VH: GAGYNFDGAYRFFDF (SEQ ID No. 9);

CDR1 de VL: RSSQRLVHSNGNTYLH (SEQ ID No. 10);

CDR2 de VL: RVSNRFP (SEQ ID No. 11); y

CDR3 de VL: SQSTHVPYT (SEQ ID No. 12).

La o las CDR, cada una independientemente, pueden o pueden no comprender una o más mutaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en comparación con las secuencias determinadas como SEQ ID No. 7 a 12, siempre y cuando el anticuerpo resultante retenga la capacidad para unirse selectivamente a TRBC1.

Los estudios han mostrado que las CDR L3 y H3 son predominantemente responsables de interacciones de alta energía con el antígeno, de modo que el anticuerpo, o fragmento funcional del mismo, puede comprender CDR3 de VH y/o CDR3 de VL como se detalla arriba.

Al utilizar expresión en fagos, se han identificado varios dominios de unión de anticuerpos adicionales, los cuales son altamente selectivos para unirse a TRBC1 por encima de TRBC2, como se describe en el Ejemplo 12.

El agente puede comprender un anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, que tiene una cadena pesada variable (VH) y/o una cadena ligera variable (VL), las cuales comprenden una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1

ID de Clon	ID de línea germinal de VH	ID de línea germinal de VL	CDR3 pesada	CDR3 ligera	Unión a TRBC1	Unión a TRBC2
CP_01_E09	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vk1_DPK1_(O18,O8)	AHNSSSWSF.....DY	QQYDNLP.....LT	403248	318
CP_01_D12	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vk1_L12	GGDTYGFL.....DN	QQFNAYP.....LT	392753	298
CP_01_D10	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk1_DPK9_(O12,O2)	GGGSFGAF.....DI	QQYNSYP.....LT	370612	306

ID de Clon	ID de línea germinal de VH	ID de línea germinal de VL	CDR3 pesada	CDR3 ligera	Unión a TRBC1	Unión a TRBC2
CP_01_C08	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vk1_DPK1_(O18,O8)	GYSSSWYL.....DY	QQYDNLP.....LT	352814	426
CP_01_C11	Vh1_DP-8,75_(1-02)	Vlambda6_6a	GGAG.....WN	QSHDSSN.....VV	349231	622
CP_01_F03	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vk1_DPK1_(O18,O8)	GYXASSWSQ.....GL	QQYDNLP.....PT	335088	306
CP_01_E07	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk2_DPK12_(A2)	DLGGSGGAF.....DI	MQSIQL.....YT	332307	394
CP_01_D03	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk3_DPK21_(L2)	NKQYGM.....DV	QQYHRWP.....LT	327666	452
CP_01_F06	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk4_DPK24_(B3)	DDGAM.....RY	QQYYDSP.....YT	325058	286
CP_01_F02	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vk1_A30	AGYSYA.....DY	LQHNSYP.....LT	301955	508
CP_02_C03	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk4_DPK24_(B3)	GGRYSSNYF.....DY	QQYFGT.....PT	274905	374
CP_02_D10	Vh3_DP-50_(3-33)	Vk3_L16	VGEGSAM.....DV	QQYNDWP.....LT	259096	517
CP_02_B01	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vlambda6_6a	VSSHYDSSGGYYAGGF.....DY	QSFDTNLS.....WV	258840	341
CP_02_D02	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk1_DPK1_(O18,O8)	GRDSSSWSP.....AY	QQYDNLP.....LT	256223	393
CP_02_A02	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda2_DPL11_(2a2)	VTTYSGLDF.....DY	SSYTSSST.....VV	252590	385
CP_02_D04	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vk1_DPK9_(O12,O2)	KGAVVVP GAL.....DY	QQYNSYP.....LT	252076	493
CP_01_E10	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk1_DPK9_(O12,O2)	NSLYGGNSA.....DL	QQTFTTP.....IT	238172	679
CP_01_H08	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk1_DPK1_(O18,O8)	DGGGGRF.....DY	QQYDNLP.....LT	223591	381
CP_01_F11	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vlambda6_6a	GGGALGRGM.....DV	QSYDTNN.....VV	222976	481
CP_01_F09	Vh5_DP-73_(5-51)	Vk1_DPK9_(O12,O2)	LLRSGGQSYAF.....DI	QQSYSTP.....LT	217934	308
CP_02_D05	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vk1_DPK1_(O18,O8)	GYSSWSF.....DY	QQYDNLP.....IT	212579	440
CP_02_A09	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vk1_DPK1_(O18,O8)	AGSSGWTL.....DY	QQYDNLP.....LT	202054	336
CP_02_D03	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vk1_DPK1_(O18,O8)	DKGWGF.....DY	QQYDNLP.....LT	199403	543
CP_02_C11	Vh5_DP-73_(5-51)	Vlambda6_6a	LGVRVGMKGF.....DY	QSYDSSN.....VV	189481	392
CP_01_H10	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk1_DPK1_(O18,O8)	SSYSSSWG.....DV	QQYDNLP.....LT	179830	424
CP_02_C04	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk1_DPK9_(O12,O2)	ANSWSAGGM.....DV	QQYDDL.....LT	172937	722
CP_01_G03	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vk2_DPK13_(O11,O1)	ERGRGYSYM.....DV	MQRIEFP.....LT	168169	360
CP_01_G06	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vlambda6_6a	VARGIHDAF.....DI	QSYDNTRH.....WV	166703	307
CP_01_D06	Vh1_DP-8,75_(1-02)	Vlambda6_6a	RHGM.....DV	QSYDSSN.....VV	162783	287
CP_02_B03	Vh5_DP-73_(5-51)	Vlambda6_6a	FDSSGYYY.....DY	QSYDSSN.....VV	158809	312
CP_02_A12	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vk3_DPK21_(L2)	DLVTTGAF.....DT	QQHNDWP.....LT	152968	280
CP_01_H03	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda6_6a	AIRVSGTPENG.....DV	QSYHSSNL.....WV	151902	590
CP_01_G08	Vh6_DP-74_(6-1)	Vk2_DPK16_(A23)	VRITHGM.....DV	MQATHFP.....QT	137502	736
CP_01_A06	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk4_DPK24_(B3)	GKLAF.....DI	QQYYSTP.....YT	136525	354
CP_02_A04	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda6_6a	NGDSSGYHTSPNWYF.....XL	QSYDDSNY.....WV	130318	385
CP_01_E08	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda2_2c	VSTDSSM.....DV	SSYAGSNTL.....FV	126690	545
CP_01_A08	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk1_DPK6_(L19)	TSQDPGAF.....DI	QQANSFP.....LT	117913	270
CP_01_D01	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda6_6a	AESGVYSSNGM.....DV	QSYDSSI.....WV	116603	204
CP_02_A07	Vh3_DP-50_(3-33)	Vlambda6_6a	VDRVRSGM.....DV	QSYDSIH.....WV	105730	496
CP_02_B08	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda6_6a	IGQYCSSTSCYM.....DV	QSYDSSTH.....WV	96003	795
CP_01_D09	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk1_DPK1_(O18,O8)	DLGGSGGAF.....DI	QQYDNLP.....LT	92079	282
CP_01_G07	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda6_6a	DSDAGYF.....DL	QSFTSSTL.....YV	77222	313
CP_01_A05	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk3_DPK21_(L2)	ASIVASGAF.....DI	QQYNKWP.....LT	75698	705
CP_02_A08	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda6_6a	AGGSNAF.....DI	QSYDDSNY.....WV	73410	295
CP_02_D07	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda6_6a	VSTDYGRQNW.....DP	QSYDSSNH.....WV	72274	367
CP_01_C04	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk1_DPK9_(O12,O2)	QYTSGRLAYYYHYM.....DV	QQSYSTP.....RT	65702	286
CP_01_A07	Vh1_DP-8,75_(1-02)	Vlambda3_DPL16_(3I)	GIRGAF.....DI	NSRDSSGNPN.....WV	63917	238

ID de Clon	ID de línea germinal de VH	ID de línea germinal de VL	CDR3 pesada	CDR3 ligera	Unión a TRBC1	Unión a TRBC2
CP_01_H02	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda6_6a	VGYSTTQL.....DY	QSYDSSNL.....WV	63410	266
CP_01_F10	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda6_6a	MAGSYAF.....DI	QSYDSSNH.....WV	58027	372
CP_02_C10	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda1_DPL2_(1c)	VGDYYDSSGYLDWYF.....DL	AVWDDRLNG.....WV	53460	488
CP_02_B05	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk1_L12	GSDTTSFVS.....DY	QQYDSYS.....LT	51480	315
CP_01_G04	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda3_3p	AGHYYYM.....DV	QSADSSGTN.....MV	50811	354
CP_01_F08	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda6_6a	VTGYPDYDSSGF.....DY	QSYDSSNH.....WV	43115	562
CP_01_G05	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda6_6a	VEGGPPYF.....DH	QSYDTRNQ.....WV	42289	409
CP_02_A03	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk4_DPK24_(B3)	NGLDNYGM.....DV	QQYYSTP.....YT	39382	322
CP_01_B09	Vh5_DP-73_(5-51)	Vk1_DPK9_(O12,O2)	LGTTKRAF.....DI	QQSYST.....RT	38766	803
CP_01_A10	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda1_DPL3_(1g)	VYVDHEGM.....DV	AAWDDSL.....WL	38613	298
CP_01_H04	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk2_DPK13_(O11,O1)	WSGSF.....DY	MQRIEFP.....LT	34030	305
CP_02_B04	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk4_DPK24_(B3)	DFGWGAF.....DI	QQYYNTP.....LI	30975	348
CP_02_A05	Vh5_DP-73_(5-51)	Vlambda6_6a	VVGGTQH.....DY	QSYDSSI.....VV	30140	309
CP_01_F07	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda6_6a	NWLLYYGDPQNAF.....DI	QSYDSTNL.....WV	29443	331
CP_01_H01	Vh5_DP-73_(5-51)	Vk1_DPK9_(O12,O2)	LYFDWFADSQNAF.....DI	QQSYSTP.....LT	26847	349
CP_01_G10	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda3_DPL16_(3l)	VGYPQLLYADYYF.....DY	NSRDSSGNH.....LV	26520	360
CP_01_G11	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk1_DPK9_(O12,O2)	GAMGL.....DY	QQSYSTP.....FT	26087	292
CP_01_G01	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda3_DPL16_(3l)	VYYLSGVHAF.....DV	DSRDTRVNX.....WI	25464	423
CP_01_A12	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vk1_DPK1_(O18,O8)	TERWLQF.....DY	QQYDNL.....PS	23458	331
CP_01_H05	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk2_DPK15_(A19,A3)	NGDYAF.....DY	MQALQTP.....YT	20298	322
CP_02_B07	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda6_6a	ASRYSGSYHF.....DY	QSYDSSN.....VV	19598	217
CP_01_G09	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vlambda2_DPL11_(2a2)	HGSQGE.....DI	SSYTSSST.....LV	18725	449
CP_02_C02	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk2_DPK15_(A19,A3)	VGYMGGM.....DV	MQALQTP.....YT	18320	468
CP_01_D05	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda6_6a	NTPGIAAAGP.....DS	QSYDSTNH.....WV	17240	299
CP_01_D08	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vlambda6_6a	VGTTTTSF.....DY	QSYDSANL.....WV	16499	291
CP_02_A11	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vlambda6_6a	VGGPLNDAF.....DI	QSFDENIS.....WV	13370	329
CP_02_D08	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vk3_DPK22_(A27)	HSSGGAF.....DI	HQSATSP.....LT	12277	560

En casos donde el agente es un anticuerpo de dominios, puede comprender 3 CDR, es decir, ya sea CDR1 a CDR3 de VH o CDR1 a CDR3 de VL.

5

El agente puede comprender un anticuerpo, o fragmento funcional del mismo, el cual comprende una cadena pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 1, y una cadena ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 2.

10

SEQ_ID_1 VH de Jovi-1

EVRLQQSGPDLIKPGASVKMSCKASGYTFTGYVMHWVKQRPGQGLEWIGFINPYN
DDIQSNERFRGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGAGYNFDGAYRFF
DFWGQGTTLTVSS

SEQ_ID_2 VL de Jovi-1

DVVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRV
SNRFPQVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHVPYTFGGGKLEIKR

5

El agente puede comprender un ScFv que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 3.

SEQ_ID_3 scFv de Jovi-1

10 EVRLQQSGPDLIKPGASVKMSCKASGYTFTGYVMHWVKQRPQGQGLEWIGFINPYN
DDIQSNERFRGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGAGYNFDGAYRFF
DFWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSS
QRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFPQVPDRFSGSGSGTDFTLKISR
VEAEDLGIYFCSQSTHVPYTFGGGKLEIKR

15

Alternativamente, el agente puede comprender un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, el cual comprende:

- (i) la CDR3 de cadena pesada y/o la CDR3 de cadena ligera;
- (ii) la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y/o la CDR1, CDR2 y
20 CDR3 de cadena ligera; o
- (iii) la cadena pesada variable (VH) y/o la cadena ligera variable (VL);
a partir de uno de los scFv mostrados como SEQ ID No. 13 a 22.

25 En las secuencias mostradas como SEQ ID No. 13 a 22, las porciones VH y VL de la secuencia se muestran en negras, y las secuencias de CDR1 y CDR2 para las cadenas pesada y ligera se subrayan. Las secuencias de CDR3 para VH y VL se determinan en la Tabla 1.

SEQ ID No. 13_(CP_01_E09)

30 **QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD**
GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAHN SSSWSFDY
WGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSI
SSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS SLQPEDIATY
YCQYDNLPLTFGGGKVDIKRTAAA

35

SEQ ID No. 14 (CP_01_D12)

EVQLLES~~GGGV~~QPG~~SLRL~~SCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQ~~MNSLRAEDTAVYYCAKGGDTYGFLDN
WGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCRASQS
ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS~~SLQ~~PEDFA
5 TYYCQQFNAYPLTFGGG~~TKVEIK~~RTAAA

SEQ ID No. 15 (CP_01_D10)

QVQLVESGGGLVQPG~~SLRL~~SCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSSKYYADSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQ~~MNSLRAEDTAVYYCAKGGGSFGAFDIW
10 GQGT~~LVTV~~SSGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQ~~SIS~~
RYLNWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS~~SLQ~~PEDFATY
YCQQYNSYPLTFGGG~~TKLEIK~~RTAAA

SEQ ID No. 16 (CP_01_C08)

15 EVQLLESGGGAVQPG~~SLRL~~SCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQ~~MNSLRAEDTAVYYCASGYSSSWYLDY
WGQGT~~LVTV~~SSGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCQASQD
ISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS~~SLQ~~PEDIAT
YYCQQYDNLPLTFGGG~~TKVEIK~~RTAAA

SEQ ID No. 17 (CP_01_C11)

20 QVQLVESGAEVKKPGASVKV~~SCK~~ASGYTFTGYMH~~WVR~~QAPGQGLEWMGRINP
NSGGTNYAQKFQGRVTMT~~R~~DT~~S~~ISTAYMEL~~SRL~~RSDDTAVYYCASGGAGWNWG
QGTM~~TVTV~~SSGGGGSGGGGSGGGASN~~F~~MLTQPHSVSESPGKTATISCTRSSGSIAS
25 NYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRPFGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEA
DYCQSHDSSNVVFGGGTQLTVLGQPAA

SEQ ID No. 18 (CP_01_F03)

30 EVQLVESGGGVVQPG~~SLRL~~SCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQ~~MNSLRAEDTAVYYCARGY?ASSWSQG
LWGQGT~~LVTV~~SSGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPSSLSASVRDRVITITCQASQ
DISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS~~SLQ~~PEDIA
TYYCQQYDNLPPTFGGG~~TKVEIK~~RTAAA

SEQ ID No. 19 (CP_01_E07)

35 QVQLVESGGGVVQPG~~SLRL~~SCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQ~~MNSLRAEDTAVYYCAKDLGGSGGAFDI

WGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIVMTQTPHSLSVTPGQPASISCKSSQS
LLYSDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE
AEDVGVYYCMQSIQLYTFGQGTKVDIKRTAAA

5 SEQ ID No. 20 (CP_01_D03)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAPGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNKQYGM DVWG
QGT LTVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIVMTQSPATLSLAPGERATLSCRASQSVG
SNLAWYQQKPGQAPSLLIYDASTRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQSEDI AVYY
 10 **CQQYHRWPLTFGGGTKVEIKRTAAA**

SEQ ID No. 21 (CP_01_F06)

EVQLLES GGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDDGAMRYWGQ
 15 **GTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKKSSQSVLY**
SSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQQYYDSPYTFGQGTKVDIKRTAAA

SEQ ID No. 22 (CP_01_F02)

20 **QVQLVESGGGVVQPGRPLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD**
GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGYSYADYWG
QGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIR
NDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLOSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATY
YCLQHNSYPLTFGGGTKVDIKRTAAA

25

ESPECIFICIDAD PARA TRBC2

Al utilizar expresión en fagos, se han identificado varios dominios de unión de anticuerpos, los cuales son altamente selectivos para unirse a TRBC2 por encima de
 30 TRBC1, como se describe en el Ejemplo 12.

El agente puede comprender un anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, que tiene una cadena pesada variable (VH) y/o una cadena ligera variable (VL), las cuales comprenden una o más de las regiones determinantes de la
 35 complementariedad (CDR) mostradas en la Tabla 2.

Tabla 2

ID de clon	Número VH dp	Número VL dp	Grupo CDR	CDR3 pesada	Grupo CDR	CDR ligera	Unión TRBC 2	Unión TRBC 1
CP_03_E05	Vh3_DP-47_(3-23)	Vlambda6_6a	38	TRSSGAF.....DI	11	HSYDSNNH.....SV	217270	1617
CP_03_D05	Vh1_DP-8,75_(1-02)	Vlambda3_DPL23_(3r)	33	PRGRGSF.....DI	27	QAWDTNLG.....GV	212721	762
CP_03_H06	Vh3_DP-35_(3-11)	Vlambda6_6a	20	ARVGGM.....DV	19	QSFADNLH.....VV	167971	391
CP_03_C12	Vh1_DP-8,75_(1-02)	Vk2_DPK12_(A2)	27	DTGPL.....DY	5	MQGIQLP.....PT	167371	789
CP_03_G02	Vh1_DP-7_(1-46)	Vk1_DPK9_(O12,O2)	10	GVWNSGSLGF.....DY	30	QSYSTP.....LT	151586	787
CP_03_D04	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vlambda6_6a	28	GGFTVPGGAF.....DI	13	QSYDASN.....VI	143051	1210
CP_03_F10	Vh1_DP-8,75_(1-02)	Vlambda2_2c	42	FGERYAF.....DI	9	SAYTGSN.....YV	139767	1683
CP_03_G09	Vh6_DP-74_(6-1)	Vlambda3_3j	34	DQWLANYYYYGM.....DV	34	QVWDSNS.....WV	138659	979
CP_03_F09	Vh1_DP-7_(1-46)	Vlambda6_6a	8	NRGGSYKSVGM.....DV	36	QSYDEVS.....VV	131852	889
CP_03_D09	Vh1_DP-15_(1-08)	Vlambda6_6a	11	VSSYYGM.....DV	28	QSYNSNH.....WV	128690	544
CP_03_F02	Vh1_DP-15_(1-08)	Vlambda6_6a	3	APASSAH.....DH	14	QSYDSSH.....VV	127081	1507
CP_02_E03	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vk1_DPK9_(O12,O2)	16	QRGYYYG.....DV	12	QQRSTP.....LT	122650	1979
CP_03_H07	Vh3_DP-31_(3-09)	Vlambda2_DPL11_(2a2)	14	SSVAAGAF.....DI	22	SSYTSSST.....WV	120948	1233
CP_03_C02	Vh5_DP-73_(5-51)	Vlambda2_DPL10_(2b2)	13	LSGRGLGF.....DY	10	SSYAGSSNL.....WV	100238	1904
CP_03_E09	Vh1_DP-8,75_(1-02)	Vlambda2_DPL11_(2a2)	5	DHYF.....DY	21	NSYTRSST.....LV	99580	1011
CP_03_D08	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vlambda6_6a	19	SGRRVTAL.....DY	8	QSYDDTN.....VV	92074	453
CP_03_E11	Vh1_DP-8,75_(1-02)	Vlambda3_3h	37	MGRYSSSW.....NI	3	QAWDTNIG.....GV	91813	940
CP_03_B05	Vh5_DP-73_(5-51)	Vlambda2_DPL10_(2b2)	12	HSRFGPAF.....DI	23	SSYAGSNN.....YV	88004	815
CP_03_H02	Vh1_DP-8,75_(1-02)	Vlambda3_DPL23_(3r)	25	DREAF.....DI	3	QAWDTNIG.....GV	87576	1829
CP_03_D02	Vh5_DP-73_(5-51)	Vlambda2_DPL10_(2b2)	7	LRGRYSYGSDAF.....DI	17	SSYAGSST.....FV	84907	1096
CP_03_E01	Vh1_DP-8,75_(1-02)	Vlambda3_DPL16_(3I)	36	LLNAVTYAF.....DI	4	NSRDSSGF.....PV	81606	498
CP_03_C11	Vh1_DP-8,75_(1-02)	Vlambda2_DPL11_(2a2)	2	IGVIGGF.....DY	18	SSYTSSS.....IL	78572	1079
CP_03_B12	Vh3_DP-47_(3-23)	Vlambda6_6a	9	IEYSSSPYF.....DY	16	QSYDSNNR.....VL	70734	1120
CP_03_E03	Vh1_DP-7_(1-46)	Vlambda3_DPL16_(3I)	18	DLLPTTVTTTGAF.....DI	7	SSRDSSGNH.....LV	69661	356
CP_03_F01	Vh1_DP-8,75_(1-02)	Vlambda3_DPL23_(3r)	40	DSGSYS.....DY	3	QAWDTNIG.....GV	66921	1633
CP_03_C01	Vh6_DP-74_(6-1)	Vlambda3_3j	31	ASYPYYYYYG.....DV	29	QVWDSSTAN.....W v	58194	825
CP_03_G07	Vh6_DP-74_(6-1)	Vlambda6_6a	41	ALGHF.....DF	32	QSYDSSNH.....VV	57147	1278
CP_03_E02	Vh5_DP-73_(5-51)	Vlambda2_DPL11_(2a2)	35	FTTGSAL.....YM	26	SSYAGNSN.....LV	52212	362
CP_03_C07	Vh1_DP-8,75_(1-02)	Vlambda3_DPL23_(3r)	17	DASGY.....DY	3	QAWDTNIG.....GV	43547	1074
CP_03_H04	Vh1_DP-8,75_(1-02)	Vlambda1_DPL5_(1b)	1	DLGTYYYGSGD.....DY	2	GTWDSLSAG.....Q v	35180	1103
CP_03_E06	Vh1_DP-8,75_(1-02)	Vlambda3_DPL16_(3I)	39	VGELLGAF.....DI	35	SSLDSNDNH.....PI	34777	917
CP_03_H03	Vh1_DP-5_(1-24)	Vlambda1_DPL2_(1c)	15	GL.....GV	37	AAWDDSLNG.....YV	33358	1405
CP_03_G11	Vh5_DP-73_(5-51)	Vlambda2_DPL12_(2e)	23	HSGVGGLAF.....DI	31	SSYAGSST.....YV	30854	836
CP_03_G01	Vh6_DP-74_(6-1)	Vk1_L9	4	GGIAAALAF.....DI	20	HQYDVYP.....PT	30762	1039
CP_03_H01	Vh1_DP-15_(1-08)	Vlambda3_DPL16_(3I)	30	VEYSRNGM.....DV	6	NSRDSSGNH.....LV	29826	1203
CP_03_F11	Vh1_DP-15_(1-08)	Vlambda6_6a	22	GRYN.....LI	15	QSYDSSN.....WV	24172	1152
CP_03_C06	Vh1_DP-14_(1-18)	Vlambda6_6a	32	LDYYYGM.....DV	33	QSYDSSN.....QV	23031	937
CP_03_D03	Vh1_DP-15_(1-08)	Vlambda6_6a	26	GGLSSAF.....DI	24	QSYDSSN.....VV	22905	1283
CP_03_G05	Vh5_DP-73_(5-51)	Vlambda2_DPL12_(2e)	6	YGGGL.....DV	25	SSYAGSYT.....LV	22037	813
CP_03_G12	Vh3_DP-47_(3-23)	Vlambda2_DPL11_(2a2)	21	PDHLTVF.....DY	1	SSYTPSS.....VL	20349	942
CP_03_C10	Vh1_DP-8,75_(1-02)	Vlambda3_DPL23_(3r)	24	VGYG.....DV	3	QAWDTNIG.....GV	18438	896
CP_03_F04	Vh1_DP-8,75_(1-02)	Vlambda3_DPL23_(3r)	29	YEGYAGF.....DY	3	QAWDTNIG.....GV	13541	1047

El agente puede comprender un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, el cual comprende:

- (i) la CDR3 de cadena pesada y/o la CDR3 de cadena ligera;
 - (ii) la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y/o la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera; o
 - (iii) la cadena pesada variable (VH) y/o la cadena ligera variable (VL);
- a partir de uno de los scFv mostrados como SEQ ID No. 23 a 32.

En las secuencias mostradas como SEQ ID No. 23 a 32, las porciones VH y VL de la secuencia se muestran en negras, y las secuencias de CDR1 y CDR2 para las cadenas pesada y ligera se subrayan. Las secuencias de CDR3 para VH y VL se determinan en la Tabla 2.

SEQ ID No. 23 (CP_03_E05)

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTRSSGAFDIWG
QGTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGASNFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIAS
KYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRP**SGVPDRFSGSIDTSSNSASLTISGLRTEDEA**
DYYCHSYDSNNHSVF**GGGTKVTVLGQPAA**

SEQ ID No. 24 (CP_03_D05)

QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGRINP
NSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCASPRGRGSAFDI
WGQGT**LT****TVSSGGGGSGGGGSGGGASSYELTQPPSVSVSPGQTATISCSGDQLG**
GKYGH**WYQKKPGQSPVLVLYQDRKRP****AGIPERFSGSSSGNTITLTISGTQAVDEA**
DYYCQAWDTNLGGVF**GGGTKVTVLGQPAA**

SEQ ID No. 25 (CP_03_H06)

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSS
GSTIYADSV**EGRFTISRDN****AKNSLYLQMNSLR****TEDTAVYYCARARVGGMDVWGQ**
GTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGASNFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASN
YVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRP**SGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEAD**
YYCQSF**DADNLHVVF****GGGTKLTVLGQPAA**

SEQ ID No. 26 (CP_03_C12)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINP
NSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLR**SEDTAVYYCARDTGPIDYWGQ**

GTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHS
DGKTYLYWYLQKPGQPPQLLVYEVSNRFSGVDPDKFSGSGSGTDFTLKISRVEAED
VGVYYCMQGIQLPPTFGGGTKVDIKRTAAA

5 SEQ ID No. 27 (CP_03_G02)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGIINPSG
GSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSIVYMELSSLRSEDTAVYYCARGVWNSGSYLGFD
YWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQ
DISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF

10 ATYYCQQSYSTPLTFGGGKLEIKRTAAA

SEQ ID No. 28 (CP_03_D04)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGFTVPGGAFD
15 IWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGASNFMLTQPHSVSDSPGKTVTISCTIRSSG
RIGSNFVQWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPARFSGSIDSSSNSASLTISGLTTA
DEAGYYCQSYDASNVIFFGGGKLTVLGQPAA

SEQ ID No. 29 (CP_03_F10)

20 EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHVRQAPGQGLEWMGRINP
NSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFGERYAFDIW
GQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGASQSELTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSTDV
GAFHFVSWYQHTPGKAPKLLISEVRKRASGVDPDRFSGSRSGNTASLTVSGLQSED
EADYFCSAYTGSNYVFGSGTKLTVLGQPAA

25

SEQ ID No. 30 (CP_03_G09)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTY
YRSKWyNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDQWLANY
YYGMDVWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGASSYELTQPLSVSVALGQTARITC
30 GGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDNNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISKAQ
AGDEADYYCQVWDSNSWVFGGGKLTVLGQPAA

SEQ ID No. 31 (CP_03_F09)

35 QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFASYYMHVRQAPGQGLEWMGIINP
SGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSRLSDDTAVYYCASNRGGSYKSV
GMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGASNFMLTQPQSVSESPGKTVTISCT

RSSGNFASKYVQWYQQRPGSSPTTVIYENYQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSATLTIS
GLKTEDEADYYCQSYDEVSVVFGGGTQLTVLGQPAA

SEQ ID No. 32 (CP_03_D09)

5 **EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCEASGYTFTSYAISWVRQAPGQGLEWMGWMNP**
NSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSED
TAVYYCARVSSYYGMDV
WGQGT
TLTVSSGGGGSGGGGSGGGASNFMLTQPLSVSESPGKTVTISCTRSSGSI
ASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTED
EADYYCQSYNSSNHVWVFGGGTKVTVLGQPAA

10

Variantes de las secuencias de aminoácidos anteriores también pueden utilizarse en la presente invención, siempre y cuando el anticuerpo resultante se una a TRBC1 o TRBC2 y no reaccione en forma cruzada significativamente. Típicamente, estas variantes tienen un alto grado de identidad de secuencias con una de las secuencias

15 especificadas arriba.

Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación se conocen bien en la técnica.

20 La Herramienta Local Básica de Búsqueda de Alineamientos (BLAST) del NCBI se encuentra disponible en varias fuentes, incluyendo el Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI, Bethesda, Md.) y en la Internet, para su uso en relación con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Una descripción sobre cómo determinar la identidad de secuencias al utilizar

25 este programa se encuentra disponible en el portal en red del NCBI en Internet.

Las variantes del dominio VL o VH o scFv típicamente tienen por lo menos aproximadamente 75%, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencias con las secuencias

30 determinadas como SEQ ID Nos 1 a 3, 13 a 32.

Típicamente, las variantes pueden contener una o más sustituciones conservativas de aminoácidos, en comparación con la secuencia original de aminoácidos o de ácido nucleico. Las sustituciones conservativas son las sustituciones que no afectan

35 o disminuyen sustancialmente la afinidad de un anticuerpo para unirse a TRBC1 o TRBC2. Por ejemplo, un anticuerpo humano que se une específicamente TRBC1 o TRBC2, puede incluir hasta 1, hasta 2, hasta 5, hasta 10 o hasta 15 sustituciones

conservativas en cualquiera o ambas VH o VL, en comparación con cualquiera de las secuencias determinadas como SEQ ID No. 1 a 3 o 13 a 32, y retienen una unión específica a TRBC1 o TRBC2.

- 5 Aminoácidos funcionalmente similares, los cuales pueden intercambiarse por medio de sustituciones conservativas, son ampliamente conocidos por un experto en la técnica. Los siguientes seis grupos son ejemplos de aminoácidos que se consideran sustituciones conservativas entre sí: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R),
10 Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

PREPARACIÓN DE ANTICUERPOS

- La preparación de anticuerpos puede realizarse al utilizar técnicas de laboratorio
15 estándar. Los anticuerpos pueden obtenerse a partir de suero de animales o, en el caso de anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos, producirse en cultivo celular. La tecnología de DNA recombinante puede utilizarse para producir los anticuerpos de acuerdo con procedimientos establecidos, en cultivo celular bacteriano o de mamífero.

- 20 Los métodos para la producción de anticuerpos monoclonales son ampliamente conocidos en la técnica. Brevemente, los anticuerpos monoclonales típicamente se producen al fusionar células de mieloma con las células esplénicas de un ratón o conejo que se ha inmunizado con el antígeno deseado. En la presente, el antígeno
25 deseado es el péptido TRBC1 o TRBC2, o una cadena TCR β que comprende ya sea TRBC1 o TRBC2.

- Alternativamente, los anticuerpos y moléculas relacionadas, particularmente los scFv, pueden producirse fuera del sistema inmune al combinar bibliotecas de cadenas VH
30 y VL de manera recombinante. Estas bibliotecas pueden construirse y analizarse selectivamente al utilizar tecnología de expresión en fagos, como se describe en el Ejemplo 12.

IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS SELECTIVOS PARA TRBC1/TRBC2

- 35 Los anticuerpos que son selectivos para TRBC1 o TRBC2 pueden identificarse al utilizar métodos que son estándar en la técnica. Los métodos para determinar la especificidad de unión de un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, ELISA,

inmunotransferencia tipo Western, inmunohistoquímica, citometría de flujo, transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), bibliotecas de expresión en fagos, análisis selectivo de doble híbrido en levaduras, coimmunoprecipitación, complementación de fluorescencia bimolecular y purificación por afinidad en tándem.

5

Para identificar un anticuerpo que es selectivo para TRBC1 o TRBC2, se valora la unión del anticuerpo a cada una de TRBC1 y TRBC2. Típicamente, esto se valora al determinar la unión del anticuerpo a cada TRBC por separado. Un anticuerpo que es selectivo se une a TRBC1 o TRBC2 sin unión significativa a la otra TRBC.

10

MIMÉTICOS DE ANTICUERPOS

El agente alternativamente puede ser una molécula que no se deriva o se basa en una inmunoglobulina. Una serie de proteínas con repeticiones diseñadas (DRP) de “miméticos de anticuerpos” se ha desarrollado para explotar las capacidades de unión de polipéptidos que no son de anticuerpos.

15

Las proteínas con repeticiones, tales como proteínas con repeticiones ricas en anquirina o leucina, son moléculas de unión ubicuas que se presentan, a diferencia de los anticuerpos, en forma intra y extracelular. Su arquitectura modular única presenta unidades estructurales repetidas (repeticiones) que se apilan en conjunto para formar dominios repetidos alargados que exhiben superficies de unión a objetivos variables y modulares. Con base en esta modularidad, pueden generarse bibliotecas combinatorias de polipéptidos con especificidades de unión altamente diversificadas. Las DARPIn (Proteínas con Repeticiones de Anquirina Diseñadas) son un ejemplo de un mimético de anticuerpo con base en esta tecnología.

20

25

Para las anticalinas, la especificidad de unión se deriva de las lipocalinas, una familia de proteínas que realizan una diversidad de funciones *in vivo* asociadas con el transporte y almacenamiento fisiológico de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Las lipocalinas tienen una robusta estructura intrínseca que comprende un barril β altamente conservado, el cual soporta cuatro asas en un extremo terminal de la proteína. Estas dan vueltas para la entrada a una cavidad de unión, y las diferencias de conformación en esta parte de la molécula dan cuenta de la variación en la especificidad de unión entre diferentes lipocalinas.

30

35

Los avímeros se desarrollan a partir de una gran familia de dominios de receptores extracelulares humanos por barajado de exones *in vitro* y expresión en fagos, lo que genera proteínas de dominios múltiples con propiedades de unión e inhibitorias.

- 5 Los versacuerpos son pequeñas proteínas de 3 a 5 kDa con >15% de cisteínas que forman un andamiaje de alta densidad de disulfuros, que reemplaza el núcleo hidrofóbico presente en la mayor parte de las proteínas. El reemplazo de un gran número de aminoácidos hidrofóbicos, lo que comprende el núcleo hidrofóbico, con un pequeño número de disulfuros, tiene como resultado una proteína que es más
- 10 pequeña, más hidrofílica, más resistente a las proteasas y calor, y tiene una densidad menor de epítomos de células T. La totalidad de estas cuatro propiedades tiene como resultado una proteína que tiene una inmunogenicidad reducida en forma considerable. También pueden producirse en *E. coli*, y son altamente solubles y estables.

15

CONJUGADOS

El anticuerpo o mimético puede ser un conjugado del anticuerpo o mimético y otro agente o anticuerpo, por ejemplo, el conjugado puede ser una entidad detectable o una entidad quimioterapéutica.

20

La entidad detectable puede ser una fracción fluorescente, por ejemplo, un péptido fluorescente. Un "péptido fluorescente" se refiere a un polipéptido que, después de la excitación, emite luz en una longitud de onda detectable. Ejemplos de proteínas fluorescentes incluyen, pero no se limitan a, isotiocianato de fluoresceína (FITC),

25 ficoeritrina (PE), aloficocianina (APC), proteína verde fluorescente (GFP), GFP potenciada, proteína roja fluorescente (RFP), proteína azul fluorescente (BFP) y mCherry.

- Un agente selectivo para TRBC1 o TRBC2, conjugado a una entidad detectable,
- 30 puede utilizarse para determinar la TRBC de una célula T maligna.

Una entidad quimioterapéutica, como se utiliza en la presente, se refiere a una entidad que es destructiva para una célula, en cuanto a que la entidad reduce la viabilidad de la célula. La entidad quimioterapéutica puede ser un fármaco citotóxico.

- 35 Un agente quimioterapéutico contemplado incluye, sin limitación, agentes alquilantes, nitrosoureas, etileniminas/metilmelamina, alquil sulfonatos, antimetabolitos, análogos de pirimidina, epipodofilotoxinas, enzimas tales como L-asparaginasa; modificadores

- de respuestas biológicas tales como IFN α , IL-2, G-CSF y GM-CSF; complejos de coordinación de platino tales como cisplatina y carboplatina, antracenedionas, urea sustituida tal como hidroxiiurea, derivados de metilhidrazina incluyendo N-metilhidrazina (MIH) y procarbazona, depresores adrenocorticales tales como mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida; hormonas y antagonistas incluyendo antagonistas de adrenocorticosteroides tales como prednisona y equivalentes, dexametasona y aminoglutetimida; progestina tal como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de megestrol; estrógenos tales como equivalentes de dietilestilbestrol y etinilestradiol; antiestrógenos tales como tamoxifeno; andrógenos incluyendo propionato de testosterona y fluoximesterona/equivalentes; antiandrógenos tales como flutamida, análogos de la hormona liberadora de gonadotropina y leuprólido; y antiandrógenos no esteroideos tales como flutamida.
- 15 Un agente selectivo para TRBC, conjugado a una entidad quimioterapéutica, posibilita el suministro orientado de la entidad quimioterapéutica a las células que expresan TRBC1 o TRBC2.

ACOPLADORES BIESPECÍFICOS DE CÉLULAS T

- 20 Se ha desarrollado una amplia diversidad de moléculas que se basan en el concepto básico de tener dos dominios de unión similares a anticuerpos.

- Las moléculas acopladoras biespecíficas de células T son una clase de moléculas biespecíficas tipo anticuerpo, que se han desarrollado principalmente para su uso como fármacos contra el cáncer. Las mismas dirigen el sistema inmune de un hospedador, más específicamente la actividad citotóxica de las células T, contra una célula objetivo, tal como una célula cancerosa. En estas moléculas, un dominio de unión se une a una célula T mediante el receptor CD3, y el otro a una célula objetivo, tal como una célula tumoral (mediante una molécula específica de tumores). Dado que la molécula biespecífica se une tanto a la célula objetivo como a la célula T, lleva a la célula objetivo cerca de la célula T a fin de que la célula T pueda ejercer su efecto, por ejemplo, un efecto citotóxico, sobre una célula cancerosa. La formación del complejo célula T:Ab biespecífico:célula cancerosa induce señalización en la célula T, que conduce, por ejemplo, a la liberación de mediadores citotóxicos. Idealmente, el agente sólo induce la señalización deseada en presencia de la célula objetivo, lo que conduce a eliminación selectiva.

Se han desarrollado moléculas de acoplamiento de células T biespecíficas en una serie de formatos diferentes, pero uno de los más comunes es una fusión que consiste en dos fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de anticuerpos diferentes. Estos algunas veces se denominan BiTE (acopladores biespecíficos de células T (Bi-specific T-cell Engagers)).

El agente utilizado en el método de la presente invención puede ser una molécula biespecífica que reconoce selectivamente a TRBC1 o TRBC2, y es capaz de activar una célula T. Por ejemplo, el agente puede ser un BiTE. El agente utilizado en el método puede comprender:

- (i) un primer dominio que se une ya sea a TRBC1 o TRBC2; y
- (ii) un segundo dominio capaz de activar una célula T.

La molécula biespecífica puede comprender un péptido de señal para ayudar en su producción. El péptido de señal puede dar lugar a que la molécula biespecífica se secrete por una célula hospedadora, de tal modo que la molécula biespecífica pueda recolectarse a partir del sobrenadante de las células hospedadoras.

El péptido de señal puede estar en el extremo amino terminal de la molécula. La molécula biespecífica puede tener la fórmula general: Péptido de señal - primer dominio - segundo dominio.

La molécula biespecífica puede comprender una secuencia espaciadora para conectar el primer dominio con el segundo dominio, y separar espacialmente los dos dominios.

La secuencia espaciadora, por ejemplo, puede comprender una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8. El enlazador alternativamente puede comprender una secuencia enlazadora alternativa que tiene propiedades espaciadoras de longitud y/o dominio similares a las de una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8.

La molécula biespecífica puede comprender un JOVI-1, o un fragmento funcional del mismo, como se define arriba.

RECEPTOR ANTIGÉNICO QUIMÉRICO (CAR)

Los receptores antigénicos quiméricos (CAR), también conocidos como receptores quiméricos de células T, receptores artificiales de células T e inmunorreceptores

quiméricos, son receptores diseñados, que injertan una especificidad arbitraria en una célula inmune efectora. En un CAR clásico, la especificidad de un anticuerpo monoclonal se injerta en una célula T. Los ácidos nucleicos que codifican CAR pueden transferirse a células T al utilizar, por ejemplo, vectores retrovirales. En esta forma, puede generarse un gran número de células T específicas de cáncer para transferencia celular adoptiva. Los estudios clínicos de fase I de esta estrategia muestran eficacia.

El dominio de unión a antígenos objetivo de un CAR comúnmente se fusiona, mediante un espaciador y un dominio transmembranal, a un endodominio que comprende o se asocia con un dominio de señalización intracelular de células T. Cuando el CAR se une al antígeno objetivo, esto resulta en la transmisión de una señal de activación a la célula T en que se expresa.

El agente utilizado en el método de la presente invención puede ser un CAR que reconoce selectivamente a TRBC1 o TRBC2. El agente puede ser una célula T que expresa un CAR, el cual reconoce selectivamente a TRBC1 o TRBC2.

El CAR también puede comprender un dominio transmembranal que abarca la membrana. El mismo puede comprender una hélice alfa hidrofóbica. El dominio transmembranal puede derivarse de CD28, lo que ofrece una buena estabilidad del receptor.

El endodominio es la porción del CAR involucrada en la transmisión de señales. El endodominio comprende o se asocia con un dominio intracelular de señalización de células T. Después del reconocimiento de antígenos, los receptores se agrupan y se transmite una señal a la célula. El componente de señalización de células T más comúnmente utilizado es el de CD3-zeta, el cual contiene 3 ITAM. Este transmite una señal de activación a la célula T después de que se une el antígeno. CD3-zeta no puede proporcionar una señal de activación completamente competente y puede necesitarse una señalización coestimulante adicional. Por ejemplo, CD28 y OX40 quiméricos pueden utilizarse con CD3-Zeta para transmitir una señal proliferativa/de supervivencia, o los tres pueden utilizarse en conjunto.

El endodominio del CAR puede comprender el endodominio de CD28 y el endodominio de OX40 y CD3-Zeta.

El CAR puede comprender un péptido de señal a fin de que, cuando el CAR se exprese dentro de una célula, tal como una célula T, la proteína nascente se dirija al retículo endoplásmico y, subsecuentemente, a la superficie celular donde se expresa.

- 5 El CAR puede comprender una secuencia espaciadora para conectar el dominio de unión a TRBC con el dominio transmembranal, y separar espacialmente el dominio de unión a TRBC del endodominio. Un espaciador flexible permite que el dominio de unión a TRBC se oriente en diferentes direcciones para habilitar la unión de TRBC.
- 10 La secuencia espaciadora, por ejemplo, puede comprender una región Fc de IgG1, una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8, o una combinación de los mismos. El enlazador alternativamente puede comprender una secuencia enlazadora alternativa que tiene propiedades espaciadoras de longitud y/o dominio similares a las de una región Fc de IgG1, una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8.

15

Se encontró que los CAR que comprenden un espaciador, con base en una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8, mostraron el mejor rendimiento contra las células Jurkat (Figura 15). El espaciador, por lo tanto, puede comprender una bisagra de IgG1, un tallo de CD8 o un espaciador que tiene propiedades espaciadoras de longitud y/o dominio similares a las de una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8.

20

Un espaciador de IgG1 humana puede alterarse para remover los motivos de unión de Fc.

- 25 El CAR puede comprender el anticuerpo JOVI-1, o un fragmento funcional del mismo, como se define arriba.

El CAR puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID No. 33, 34 y 35.

30

>SEQ_ID_33 CAR de JOVI-1 con espaciador de tallo de CD8

METDTLLLWVLLVWIPGSTGEVRLQQSGPDLIKPGASVKMSCKASGYTFTGYVMHW
VKQRPQGQGLEWIGFINPYNDIQSNERFRGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAV
YYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQS
35 PLSLPVSLGDQASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFP
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIKRSDPTTTPA
PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVGGLACYS

LVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQR
 LPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL
 NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
 ERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

5

>SEQ_ID_34 CAR de JOVI-1 con espaciador H-CH2-CH3pvaa

METDTLLLWVLLVWIPGSTGEVRLQQSGPDLIKPGASVKMSCKASGYTFTGYVMHW
 VKQRPGQGLEWIGFINPYNDIQSNERFRGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAV
 YYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQS
 10 PLSLPVSLGDQASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFP
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIKRSDPAEPK
 SPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 15 NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PGKKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGP
 TRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIR
 VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
 EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
 20 PR

>SEQ_ID_35 CAR de JOVI-1 con espaciador de bisagra de IgG1

METDTLLLWVLLVWIPGSTGEVRLQQSGPDLIKPGASVKMSCKASGYTFTGYVMHW
 VKQRPGQGLEWIGFINPYNDIQSNERFRGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAV
 25 YYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQS
 PLSLPVSLGDQASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFP
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIKRSDPAEPK
 SPDKTHTCPPCPKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN
 MTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQAD
 30 AHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
 KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYD
 ALHMQALPPR

En las secuencias de CAR determinadas arriba, una o más de las 6 CDR, cada una
 35 independientemente, pueden o pueden no comprender una o más mutaciones de
 aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en comparación con las secuencias

determinadas como SEQ ID No. 7 a 12, siempre y cuando el CAR resultante retenga la capacidad para unirse a TRBC1.

Variantes de las secuencias de aminoácidos anteriores también pueden utilizarse en la presente invención, siempre y cuando el CAR resultante se una a TRBC1 o TRBC2 y no reaccione en forma cruzada significativamente. Típicamente, estas variantes tienen un alto grado de identidad de secuencias con una de las secuencias determinadas como SEQ ID No. 33, 34 o 35.

Las variantes del CAR típicamente tienen por lo menos aproximadamente 75%, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencias con una de las secuencias determinadas como SEQ ID Nos 33, 34 y 35.

ÁCIDO NUCLEICO

La presente invención además proporciona un ácido nucleico que codifica un agente, tal como un BiTE o CAR del primer aspecto de la invención.

La secuencia de ácido nucleico puede codificar un CAR que comprende una de las secuencias de aminoácidos mostradas como SEQ ID No. 33, 34 y 35.

Como se utilizan en la presente, se pretende que los términos “polinucleótido”, “nucleótido” y “ácido nucleico” sean sinónimos entre sí.

Se entenderá por un experto que numerosos polinucleótidos y ácidos nucleicos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido, como resultado de la degeneración del código genético. Además, se entenderá que los expertos, al utilizar técnicas de rutina, pueden hacer sustituciones de nucleótidos que no afectan la secuencia polipeptídica codificada por los polinucleótidos descritos aquí, para reflejar el uso de codones de cualquier organismo hospedador particular en el cual se expresarán los polipéptidos.

Los ácidos nucleicos, de acuerdo con la invención, pueden comprender DNA o RNA. Estos pueden ser de hebra sencilla o de doble hebra. También pueden ser polinucleótidos que se incluyen dentro de los nucleótidos sintéticos o modificados. Una serie de diferentes tipos de modificación para oligonucleótidos se conoce en la

técnica. Estos incluyen cadenas principales de metilfosfonato y fosforotioato, y adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para propósitos del uso, como se describe en la presente, se entenderá que los polinucleótidos pueden modificarse por cualquier método disponible en la técnica.

- 5 Estas modificaciones pueden llevarse a cabo con el fin de potenciar la actividad o vida útil *in vivo* de los polinucleótidos de interés.

Los términos “variante”, “homólogo” o “derivado”, con relación a una secuencia de nucleótidos, incluyen cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, eliminación o adición de un ácido nucleico (o más) de o a la secuencia.

10

VECTOR

La presente invención también proporciona un vector o equipo de vectores que comprenden una o más secuencias de ácidos nucleicos de la invención. Este vector puede utilizarse para introducir la o las secuencias de ácidos nucleicos en una célula hospedadora, a fin de que exprese un CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

15

El vector, por ejemplo, puede ser un plásmido o un vector viral, tal como un vector retroviral o un vector lentiviral, o un vector basado en transposones o mRNA sintético.

20

El vector puede ser capaz de transfectar o transducir una célula T o una célula NK.

25

CÉLULA

La presente invención también se relaciona con una célula, tal como una célula inmune, que comprende un CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

30

La célula puede comprender un ácido nucleico o un vector de la presente invención.

La célula puede ser una célula T o una célula asesina natural (NK).

La célula T puede ser células T o linfocitos T, los cuales son un tipo de linfocito que tiene una función central en la inmunidad mediada por células. Estos pueden distinguirse de otros linfocitos, tales como células B y células asesinas naturales

35

(células NK), por la presencia de un receptor de células T (TCR) en la superficie celular. Existen diversos tipos de células T, como se resume a continuación.

Las células T cooperadoras (células Th) ayudan a otros glóbulos blancos en los procesos inmunológicos, incluyendo maduración de células B a células plasmáticas y células B de memoria, y activación de células T citotóxicas y macrófagos. Las células Th expresan CD4 en su superficie. Las células Th se activan cuando se presentan con antígenos peptídicos por moléculas del MHC clase II en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Estas células pueden diferenciarse a uno de varios subtipos, incluyendo TH1, TH2, TH3, TH17, Th9 o TFH, que secretan diferentes citocinas para facilitar diferentes tipos de respuestas inmunes.

Las células T citolíticas (células TC, o CTL) destruyen células infectadas por virus y células tumorales, y también están implicadas en el rechazo de trasplantes. Las CTL expresan el CD8 en su superficie. Estas células reconocen sus objetivos al unirse al antígeno asociado con el MHC clase I, el cual se presenta en la superficie de todas las células con núcleo. A través de IL-10, adenosina y otras moléculas secretadas por las células T reguladoras, las células CD8+ pueden inactivarse a un estado anérgico, lo cual previene enfermedades autoinmunes tales como la encefalomiелitis autoinmune experimental.

Las células T de memoria son un subconjunto de células T específicas de antígenos que persisten a largo plazo después de que una infección se ha resuelto. Se expanden rápidamente a grandes cantidades de células T efectoras con la reexposición a su antígeno afín, lo que de esta manera dota al sistema inmune de “memoria” contra infecciones anteriores. Las células T de memoria comprenden tres subtipos: células T de memoria centrales (células TCM) y dos tipos de células T de memoria efectoras (células TEM y células TEMRA). Las células de memoria pueden ser CD4+ o CD8+. Las células T de memoria típicamente expresan la proteína de superficie celular CD45RO.

Las células T reguladoras (células Treg), anteriormente conocidas como células T supresoras, son cruciales para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Su función principal es apagar la inmunidad mediada por células T hacia el final de una reacción inmune y suprimir las células T autorreactivas que escaparon al proceso de selección negativa en el timo.

Se han descrito dos clases principales de células Treg CD4+: células Treg de origen natural y células Treg adaptadas.

5 Las células Treg de origen natural (también conocidas como células Treg CD4+CD25+FoxP3+) surgen en el timo y se han asociado a interacciones entre células T en desarrollo con células dendríticas mieloides (CD11c+) y plasmocitoides (CD123+) que se han activado con TSLP. Las células Treg de origen natural pueden distinguirse de otras células T por la presencia de una molécula intracelular denominada FoxP3. Las mutaciones del gen FOXP3 pueden impedir el desarrollo de
10 células T reguladoras, lo que da lugar a la enfermedad autoinmune fatal IPEX.

Las células Treg adaptadas (también conocidas como células Tr1 o células Th3) pueden originarse durante una respuesta inmune normal.

15 La célula puede ser una célula asesina natural (o célula NK). Las células NK forman parte del sistema inmune innato. Las células NK proporcionan respuestas rápidas a las señales innatas de células infectadas con virus en una forma independiente del MHC.

20 Las células NK (que pertenecen al grupo de células linfoides innatas) se definen como linfocitos granulares grandes (LGL) y constituyen la tercera clase de células diferenciadas a partir del progenitor linfoide común que genera linfocitos B y T. Se sabe que las células NK se diferencian y maduran en la médula ósea, nódulos linfáticos, bazo, tonsilas y timo, donde luego entran en la circulación.

25

Las células con CAR de la invención pueden ser cualquiera de los tipos celulares mencionados anteriormente.

30 Las células T o NK, que expresan el CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención, pueden crearse *ex vivo* ya sea a partir de la sangre periférica propia de un paciente (1ª parte), o en el entorno de un trasplante de células troncales hematopoyéticas de sangre periférica de donante (2ª parte), o sangre periférica de un donante sin relación (3ª parte).

35 Alternativamente, las células T o NK, que expresan un CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención, pueden derivarse de la diferenciación *ex vivo*, de células progenitoras inducibles o células progenitoras embrionarias, a células T o NK.

Alternativamente, puede utilizarse una línea de células T inmortalizadas, que retienen su función lítica y pueden actuar como agente terapéutico.

- 5 En todas estas modalidades, las células con CAR se generan al introducir DNA o RNA que codifica el CAR por uno de muchos medios, incluyendo la transducción con un vector viral, o transfección con DNA o RNA.

- 10 La célula con CAR de la invención puede ser una célula T o NK *ex vivo* de un sujeto. La célula T o NK puede ser de una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las células T o NK pueden activarse y/o expandirse antes de transducirse con ácido nucleico que codifica un CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención, por ejemplo, por el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-CD3.

- 15 La célula T o NK de la invención puede producirse por:
- (i) aislamiento de una muestra que contiene células T o NK de un sujeto u otras fuentes listadas anteriormente; y
 - (ii) transducción o transfección de las células T o NK con una secuencia o secuencias de ácidos nucleicos que codifican un CAR de la invención.

20

Las células T o NK entonces pueden purificarse, por ejemplo, seleccionarse con base en la expresión del dominio de unión a antígenos del polipéptido de unión a antígenos.

- 25 La presente invención también proporciona un equipo que comprende una célula T o NK, que comprende un CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

- 30 La presente invención también se relaciona con una composición farmacéutica que contiene una pluralidad de células que expresan un CAR del primer aspecto de la invención. La composición farmacéutica adicionalmente puede comprender un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica opcionalmente puede comprender uno o más polipéptidos y/o
- 35 compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Tal formulación, por ejemplo, puede estar en forma adecuada para infusión intravenosa.

LINFOMA Y/O LEUCEMIA DE CÉLULAS T

La presente invención se relaciona con agentes, células y métodos para tratar un linfoma y/o leucemia de células T.

- 5 Un método para tratar un linfoma y/o leucemia de células T se relaciona con el uso terapéutico de un agente. En la presente, el agente puede administrarse a un sujeto que tiene una enfermedad existente de linfoma y/o leucemia de células T con el fin de aminorar, reducir o mejorar por lo menos un síntoma asociado con la enfermedad, y/o para desacelerar, reducir o bloquear la progresión del enfermedad.

10

El método de la presente invención puede utilizarse para el tratamiento de cualquier linfoma y/o leucemia asociados con la expansión clonal de una célula que expresa un receptor de células T (TCR) que comprende una región constante β . Como tal, la presente invención se relaciona con un método para tratar una enfermedad que involucra células T malignas, las cuales expresan un TCR que comprende una TRBC.

15

El método de la presente invención puede utilizarse para tratar un linfoma de células T, en el cual la célula T maligna expresa un TCR que comprende una TRBC.

20

‘Linfoma’ se utiliza en la presente, de acuerdo con su significado estándar, para referirse a un cáncer que se desarrolla típicamente en los nódulos linfáticos, pero también puede afectar el bazo, médula ósea, sangre y otros órganos. El linfoma típicamente se presenta como tumor sólido de células linfoides. El síntoma primario asociado con el linfoma es la linfadenopatía, aunque los síntomas secundarios (B) pueden incluir fiebre, bochornos, pérdida de peso, pérdida de apetito, fatiga, dificultad respiratoria y comezón.

25

El método de la presente invención puede utilizarse para tratar una leucemia de células T, en la cual la célula T maligna expresa un TCR que comprende una TRBC.

30

‘Leucemia’ se utiliza en la presente, de acuerdo con su significado estándar, para referirse a un cáncer de la sangre o médula ósea.

Lo siguiente es una lista ilustrativa no exhaustiva de enfermedades que pueden tratarse por el método de la presente invención.

35

LINFOMA DE CÉLULAS T PERIFÉRICAS

Los linfomas de células T periféricas son linfomas relativamente inusuales y dan cuenta de menos de 10% de todos los linfomas no de Hodgkin (NHL). Sin embargo, se asocian con un curso clínico agresivo y las causas y orígenes celulares precisos de la mayor parte de los linfomas de células T aún no están bien definidos.

5

El linfoma usualmente se presenta primero como hinchazón en el cuello, axila o ingle. Puede presentarse hinchazón adicional donde se ubican otros nódulos linfáticos, tal como en el bazo. En general, los nódulos linfáticos dilatados pueden entrometerse en el espacio de los vasos sanguíneos, nervios o el estómago, lo que conduce a brazos y piernas hinchados, a hormigueo y entumecimiento, o a sensaciones de estar lleno, respectivamente. Los síntomas de linfoma también incluyen síntomas inespecíficos tales como fiebre, escalofríos, pérdida de peso inexplicable, bochornos, letargo y comezón.

10

15

La clasificación de la OMS utiliza atributos morfológicos e inmunofenotípicos, en conjunto con aspectos clínicos y, en algunos casos, la genética, para delinear una categorización pronosticada y terapéuticamente significativa para los linfomas de células T periféricas (Swerdlow *et al.*; WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed.; Lyon: IARC Press; 2008). La localización anatómica de las células T neoplásicas se asemeja en parte a sus contrapartes y funciones celulares normales propuestas y, como tales, los linfomas de células T se asocian con nódulos linfáticos y sangre periférica. Esta estrategia hace posible una mejor comprensión de una parte de las manifestaciones de los linfomas de células T, incluyendo su distribución celular, algunos aspectos de la morfología e incluso hallazgos clínicos asociados.

20

25

El más común de los linfomas de células T es el linfoma de células T periféricas no especificado de otro modo (PTCL-NOS), que comprende 25% del total, seguido por el linfoma angioinmunoblástico de células T (AITL) (18.5%).

30

LINFOMA DE CÉLULAS T PERIFÉRICAS NO ESPECIFICADO DE OTRO MODO (PTCL-NOS)

El PTCL-NOS comprende más del 25% de todos los linfomas de células T periféricas y linfomas de células NK/T, y es el subtipo más común. Se determina por un diagnóstico de la exclusión, que no corresponde a ninguna de las entidades de linfoma de células T maduro específico, listadas en la actual OMS 2008. Como tal, es análogo al linfoma grande difuso de células B no especificado de otro modo (DLBCL-

35

NOS).

La mayor parte de los pacientes son adultos con una edad media de 60 y una relación de hombres a mujeres 2:1. La mayor parte de los casos son nodulares en su origen, sin embargo, las presentaciones extranodulares se presentan en aproximadamente 13% de los pacientes y muy comúnmente involucran piel y tracto gastrointestinal.

El espectro citológico es muy amplio, y varía de polimorfo a monomorfo. Se han descrito tres variantes morfológicamente definidas , incluyendo la variante linfoepitelioide (Lennert), variante de zona T y variante folicular. La variante linfoepitelioide del PTCL contiene abundantes histiocitos epitelioides de fondo y comúnmente es positiva para CD8. Se ha asociado con un mejor pronóstico. La variante folicular del PTCL-NOS está emergiendo como una entidad clínicopatológica potencialmente distinta.

La mayor parte de los PTCL-NOS tiene un fenotipo de células T maduras y la mayor parte de los casos es positivo a CD4. Un 75% de los casos muestra pérdida variable de por lo menos un pan-marcador de células T (CD3, CD2, CD5 o CD7), y CD7 y CD5 son los subregulados más a menudo. CD30 y raramente CD15 pueden expresarse, y CD15 es un atributo de pronóstico adverso. La expresión de CD56, aunque inusual, también tiene un impacto de pronóstico negativo. Los factores adicionales de pronóstico patológico adverso incluyen una tasa de proliferación mayor a 25%, con base en la expresión de KI-67, y la presencia de más de 70% de células transformadas. El análisis inmunofenotípico de estos linfomas ha ofrecido poco ahondamiento sobre su biología.

LINFOMA ANGIOINMUNOBLÁSTICO DE CÉLULAS T (AITL)

El AITL es una enfermedad sistémica caracterizada por un infiltrado polimorfo que involucra los nódulos linfáticos, vénulas endoteliales altas (HEV) prominentes y expansión perivascular de mallas de células dendríticas foliculares (FDC). El AITL se considera como linfoma de células T *de novo* derivado de células T $\alpha\beta$ del tipo cooperador folicular (TFH), encontradas normalmente en los centros germinales.

El AITL es la segunda entidad más común entre los linfomas de células T periféricas y los linfomas de células NK/T, que comprende aproximadamente el 18.5% de los casos. Se presenta en adultos de mediana edad a ancianos, con una edad media de

65 años, y una incidencia aproximadamente igual en varones y mujeres. Clínicamente, los pacientes usualmente tienen enfermedad en fase avanzada, con linfadenopatía generalizada, hepatoesplenomegalia y síntomas constitucionales prominentes. Una erupción cutánea con prurito asociado se presenta comúnmente. A menudo hay hipergammaglobulinemia policlonal, asociada con fenómenos autoinmunes.

Se describen tres diferentes patrones morfológicos en el AITL. La primera lesión del AITL (Patrón I) usualmente muestra una arquitectura conservada con folículos hiperplásicos característicos. La proliferación neoplásica se localiza en la periferia de los folículos. En el Patrón II la arquitectura nodal se esfaca parcialmente con retención de pocos folículos revertidos. Los senos subcapsulares se conservan e incluso se dilatan. La paracorteza contiene HEV arborescentes y hay una proliferación de FDC más allá del folículo de células B. Las células neoplásicas son de tamaño pequeño a medio, con mínima atipia citológica. A menudo tienen un citoplasma claro a pálido, y pueden mostrar membranas de células T distintivas. Un fondo inflamatorio polimorfo usualmente es evidente.

Aunque el AITL es una malignidad de células T, hay una expansión característica de células B y células plasmáticas, lo cual probablemente refleja la función de las células neoplásicas como células TFH. Se presentan células B tanto positivas para EBV como negativas para EBV. Ocasionalmente, las células B atípicas pueden parecerse a células tipo Hodgkin/Reed–Sternberg, morfológica e inmunofenotípicamente, lo que algunas veces conduce a una confusión de diagnóstico con esa entidad. La proliferación de células B en el AITL puede ser extensa y algunos pacientes desarrollan linfomas grandes difusos de células B (DLBCL) secundarios y positivos a EBV o, más raramente, tumores de células B negativos a EBV, a menudo con diferenciación plasmocitaria.

Las células T neoplásicas, positivas a CD4, del AITL, muestran una fuerte expresión de CD10 y CD279 (PD-1) y son positivas para CXCL13. CXCL13 conduce a un reclutamiento incrementado de células B a los nódulos linfáticos mediante adherencia a los HEV, activación de células B, diferenciación plasmocitaria y expansión de las mallas de FDC, y todo ello contribuye a los atributos morfológicos y clínicos del AITL. Una intensa expresión de PD-1 en las células tumorales perifoliculares es particularmente útil para distinguir el Patrón I de AITL de la hiperplasia reactiva folicular y paracortical.

La variante folicular del PTCL-NOS es otra entidad con un fenotipo TFH. En

contraste con el AITL, no tiene HEV prominentes o expansión extrafolicular de mallas de FDC. Las células neoplásicas pueden formar agregados intrafoliculares, imitando al linfoma folicular de células B, pero también pueden tener un patrón de crecimiento interfolicular o involucrar zonas del manto expandidas. Clínicamente, la variante folicular del PTCL-NOS es distinta a la del AITL dado que los pacientes se presentan más a menudo con enfermedad en fase temprana con implicación parcial de nódulos linfáticos y puede carecer de los síntomas constitucionales asociados al AITL.

LINFOMA ANAPLÁSICO DE CÉLULAS GRANDES (ALCL)

EL ALCL puede subdividirse como ALCL-'linfoma anaplásico cinasa' (ALK)+ o ALCL-ALK-.

El ALCL-ALK+ es una de las entidades mejor definidas dentro de los linfomas de células T periféricas, con "células distintivas" características que llevan núcleos en forma de herradura y que expresan ALK y CD30. Da cuenta de aproximadamente el 7% de todos los linfomas de células T periféricas y células NK, y es más común en las primeras tres décadas de vida. Los pacientes a menudo se presentan con linfadenopatía, pero es común la implicación de sitios extranodales (piel, hueso, tejidos blandos, pulmón, hígado) y síntomas B.

El ALCL, ALK+ muestra un amplio espectro morfológico, con 5 diferentes patrones descritos, pero todas las variantes contienen algunas células distintivas. Las células distintivas tienen núcleos en forma de herradura o riñón excéntrico, y una prominente región perinuclear eosinofílica de Golgi. Las células tumorales crecen en un patrón cohesivo con predilección por implicación sinusal. Células tumorales más pequeñas predominan en la variante de células pequeñas y, en la variante linfohistiocítica, abundantes histiocitos enmascaran la presencia de células tumorales, muchas de las cuales son pequeñas.

Por definición, todos los casos muestran positividad a ALK y CD30, con expresión usualmente más débil en las células tumorales más pequeñas. A menudo hay pérdida de pan-marcadores de células T, y 75% de los casos carecen de expresión en superficie de CD3.

La expresión de ALK es el resultado de una alteración genética recurrente característica, que consiste en una reestructuración del gen *ALK* en el cromosoma 2p23 a uno de los muchos genes asociados, lo que resulta en la expresión de la

proteína quimérica. El gen asociado más común, que se presenta en el 75% de los casos, es el de la nucleofosmina (*NPM1*) en el cromosoma 5q35, lo que resulta en t(2;5)(p23;q35). La distribución celular de ALK puede variar en diferentes variantes de traslocación, lo que depende del gen asociado.

5

ALCL-ALK⁻ se incluye como categoría provisional en la clasificación de la OMS 2008. Se define como linfoma de células T positivas a CD30, que es morfológicamente indistinguible del ALCL-ALK⁺, con un patrón de crecimiento cohesivo y presencia de células distintivas, pero que carece de expresión de la proteína ALK.

10

Los pacientes usualmente son adultos de entre 40 y 65 años, en contraste con el ALCL-ALK⁺, el cual es más común en niños y adultos jóvenes. El ALCL-ALK⁻ puede involucrar nódulos linfáticos y tejidos extranodulares, aunque lo último se observa menos comúnmente que en el ALCL-ALK⁺. La mayor parte de los casos de ALCL-ALK⁻ demuestran el esfacelado de la arquitectura de los nódulos linfáticos por láminas de células neoplásicas cohesivas con los típicos atributos “distintivos”. En contraste con el ALCL-ALK⁺, la variante morfológica de célula pequeña no se reconoce.

15

20

A diferencia de su contraparte ALK⁺, el ALCL-ALK⁻ muestra una mayor conservación de la expresión de marcadores de células T en superficie, mientras la expresión de marcadores citotóxicos y antígeno de membrana epitelial (EMA) es menos probable. Las firmas de expresión génica y desbalances cromosómicos recurrentes son diferentes en el ALCL-ALK⁻ y ALCL-ALK⁺, lo que confirma que son entidades distintas a nivel molecular y genético.

25

El ALCL-ALK⁻ es clínicamente distinto al ALCL-ALK⁺ y PTCL-NOS, con diferencias significativas en el pronóstico entre estas tres diferentes entidades. La supervivencia global a 5 años del ALCL-ALK⁻ se informa de 49%, la cual no es tan buena como la del ALCL-ALK⁺ (a 70%), pero al mismo tiempo es significativamente mejor que la del PTCL- NOS (32%).

30

LINFOMA DE CÉLULAS T ASOCIADO A ENTEROPATÍA (EATL)

El EATL es una neoplasia agresiva que se considera derivada de las células T intraepiteliales del intestino. Dos tipos morfológica, inmunohistoquímica y genéticamente distintos de EATL están reconocidos en la clasificación de la OMS

35

2008: Tipo I (que representa la mayor parte de los EATL) y Tipo II (que comprende 10 a 20% de los casos).

El EATL de tipo I usualmente se asocia con enteropatía sensible al gluten manifiesta o clínicamente silenciosa, y se observa más a menudo en pacientes de extracción noreuropea, debido a la alta prevalencia de la celiaquía en esta población.

Más comúnmente, las lesiones del EATL se encuentran en el yeyuno o íleon (90% de los casos), con presentaciones raras en el duodeno, colon, estómago o áreas fuera del tracto gastrointestinal. Las lesiones intestinales usualmente son multifocales, con ulceración de mucosas. El curso clínico del EATL es agresivo, y la mayor parte de los pacientes mueren de la enfermedad o complicaciones de la enfermedad dentro de 1 año.

El espectro citológico del EATL de tipo I es amplio, y algunos casos pueden contener células anaplásicas. Existe un fondo inflamatorio polimorfo, el cual puede oscurecer el componente neoplásico en algunos casos. La mucosa intestinal, en las regiones adyacentes al tumor, a menudo muestra atributos de celiaquía con embotamiento de las vellosidades y aumento del número de linfocitos intraepiteliales (IEL), lo cual puede representar células precursoras de lesión.

Mediante inmunohistoquímica, las células neoplásicas a menudo son CD3+CD4-CD8-CD7+CD5-CD56-βF1+, y contienen proteínas asociadas a gránulos citotóxicos (TIA-1, granzima B, perforina). CD30 se expresa parcialmente en casi todos los casos. CD103, el cual es un receptor doméstico de mucosas, puede expresarse en el EATL.

El EATL de tipo II, también referido como linfoma intestinal de células T CD56+ monomórficas, se define como tumor intestinal compuesto de células T monomórficas de tamaño pequeño a medio, que expresan tanto CD8 como CD56. A menudo hay una diseminación lateral del tumor dentro de la mucosa, y la ausencia de un fondo inflamatorio. La mayor parte de los casos expresan el TCR γδ, sin embargo, hay casos asociados con el TCR αβ.

El EATL de tipo II tiene una distribución mundial más amplia que el EATL de Tipo I, y a menudo se observa en poblaciones asiáticas o hispánicas, en quienes la celiaquía es rara. En individuos de ascendencia europea, el EATL II representa

aproximadamente el 20% de los linfomas intestinales de células T, con un historial de celiaquía en por lo menos un subconjunto de los casos. El curso clínico es agresivo.

LINFOMA HEPATOESPLÉNICO DE CÉLULAS T (HSTL)

- 5 El HSTL es una neoplasia sistémica agresiva, por lo general derivada de células T citotóxicas $\gamma\delta$ del sistema inmune innato, sin embargo, también puede derivarse de células T $\alpha\beta$ en casos raros. Es uno de los linfomas de células T más raros, y típicamente afecta a adolescentes y adultos jóvenes (edad media, 35 años) con una fuerte predominancia masculina.

10

LINFOMA EXTRANODAL DE CÉLULAS NK/T DE TIPO NASAL

- El linfoma extranodal de células NK/T de tipo nasal es una enfermedad agresiva, a menudo con lesiones destructivas en línea media y necrosis. La mayor parte de los casos son de derivación de células NK, pero algunos casos se derivan de células T
- 15 citotóxicas. Se asocia universalmente con el Virus de Epstein-Barr (EBV).

LINFOMA CUTÁNEO DE CÉLULAS T

- El método de la presente invención también puede utilizarse para tratar el linfoma cutáneo de células T.

20

- El linfoma cutáneo de células T (CTCL) se caracteriza por la migración de células T malignas a la piel, lo cual da lugar a que aparezcan diversas lesiones. Estas lesiones cambian la conformación a medida que la enfermedad progresa, comenzando típicamente como lo que parece ser un salpullido y formando eventualmente placas y
- 25 tumores antes de la metástasis a otras partes del cuerpo.

- Los linfomas cutáneos de células T incluyen los mencionados en la siguiente lista ilustrativa y no exhaustiva: micosis fungoide, reticulosis pagetoide, síndrome de Sézary, piel granulomatosa descuidada, papulosis linfomatoide, pitiriasis liquenoide
- 30 crónica, linfoma cutáneo de células T CD30+, linfoma cutáneo secundario de células grandes CD30+, linfoma cutáneo de células T grandes CD30- en micosis no fungoide, linfoma pleomórfico de células T, linfoma de Lennert, linfoma subcutáneo de células T y linfoma angiocéntrico.

- 35 Los signos y síntomas del CTCL varían dependiendo de la enfermedad específica, de la cual los dos tipos más comunes son micosis fungoide y síndrome de Sézary. La micosis fungoide clásica se divide en tres fases:

Parche (atrófico o no atrófico): Dermatitis inespecífica, parches en tronco inferior y glúteos, prurito mínimo/ausente;

Placa: Placas intensamente pruriginosas, linfadenopatía; y

Tumor: Propenso a ulceración.

5

El síndrome de Sézary se define por eritrodermia y leucemia. Los signos y síntomas incluyen piel edematosa, linfadenopatía, hiperqueratosis palmar y/o plantar, alopecia, distrofia ungueal, ectropión y hepatoesplenomegalia.

10 De todos los linfomas cutáneos primarios, el 65% son del tipo de células T. El inmunofenotipo más común es el positivo a CD4. No hay una patofisiología común para estas enfermedades, dado que el término linfoma cutáneo de células T abarca una amplia diversidad de trastornos.

15 Los mecanismos etiológicos principales para el desarrollo del linfoma cutáneo de células T (es decir, micosis fungoide) no se han dilucidado. La micosis fungoide puede precederse por una enfermedad cutánea inflamatoria crónica mediada por células T, la cual ocasionalmente puede progresar a un linfoma fatal.

20 ALCL CUTÁNEO PRIMARIO (C-ALCL)

EL C-ALCL a menudo es indistinguible del ALC-ALK- mediante morfología. Se define como tumor cutáneo de células grandes con morfología anaplásica, pleomórfica o inmunoblástica, con más de 75% de las células expresando CD30. En conjunto con la papulosis linfomatoide (LyP), el C-ALCL pertenece al espectro de
25 trastornos linfoproliferativos cutáneos primarios de células T positivas a CD30 que, como grupo, comprenden el segundo grupo más común de enfermedades linfoproliferativas cutáneas de células T después de la micosis fungoide.

El perfil de tinción inmunohistoquímica es bastante similar al de ALCL-ALK-, con una
30 mayor proporción de casos con tinción positiva para los marcadores citotóxicos. Por lo menos 75% de las células tumorales deben ser positivas para CD30. CD15 también puede expresarse y, cuando se presenta implicación de nódulos linfáticos, el diferencial con el linfoma de Hodgkin clásico puede ser difícil. Pueden presentarse casos raros de ALCL-ALK+ con lesiones cutáneas localizadas, y puede parecerse al
35 C-ALCL.

LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS T

La leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) da cuenta de aproximadamente 15% y 25% de la ALL en cohortes pediátricas y en adultos, respectivamente. Los pacientes usualmente tienen conteos elevados de glóbulos blancos y pueden presentarse con organomegalia, particularmente alargamiento mediastínico, e implicación del SNC.

El método de la presente invención puede utilizarse para tratar la T-ALL que se asocia con una célula T maligna que expresa un TCR que comprende una TRBC.

LEUCEMIA PROLINFOCÍTICA DE CÉLULAS T

La leucemia prolinfocítica de células T (T-PLL) es una leucemia de células T maduras con un comportamiento agresivo y predilección por la sangre, médula ósea, nódulos linfáticos, hígado, bazo e implicación de la piel. La T-PLL afecta principalmente a adultos de más de 30 años. Otros nombres incluyen leucemia linfocítica crónica de células T, tipo “nudoso” de la leucemia de células T, y leucemia prolinfocítica T/leucemia linfocítica de células T.

En la sangre periférica, la T-PLL consiste en linfocitos de tamaño medio con un nucleolos únicos y citoplasma basófilo con ampollas o proyecciones ocasionales. Los núcleos usualmente son de forma redonda u ovalada, con pacientes ocasionales que tienen células con un contorno nuclear más irregular que es similar a la forma nuclear cerebriforme observada en el síndrome de Sézary. Una variante de células pequeñas comprende 20% de todos los casos de T-PLL, y la variante tipo celular de Sézary (cerebriforme) se observa en el 5% de los casos.

La T-PLL tiene el inmunofenotipo de un linfocito T maduro (postímico), y las células neoplásicas típicamente son positivas para los pan-antígenos T CD2, CD3, y CD7 y negativas para TdT y CD1a. El inmunofenotipo CD4+/CD8- se presenta en el 60% de los casos, el inmunofenotipo CD4+/CD8+ se presenta en el 25%, y el inmunofenotipo CD4-/CD8+ se presenta en el 15% de los casos

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

El método de la presente invención puede comprender la etapa de administrar el agente en forma de una composición farmacéutica.

El agente puede administrarse con un portador, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La elección del portador, excipiente o diluyente

farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la ruta de administración pretendida y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como (o además de) el portador, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante o aglutinantes, lubricante o lubricantes, agente o agentes de suspensión, agente o agentes de recubrimiento, agente o agentes solubilizantes, y otros agentes portadores adecuados.

ADMINISTRACIÓN

La administración del agente puede conseguirse al utilizar cualquiera de una diversidad de rutas que hacen biodisponible al ingrediente activo. Por ejemplo, el agente puede administrarse por las rutas oral y parenteral, en forma intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, transcutánea, intramuscular, mediante suministro local, por ejemplo, por catéter o endoprótesis vascular.

Típicamente, un médico determinará la dosificación real que será más adecuada para un sujeto individual, y variará con la edad, peso y respuesta del paciente particular. La dosificación es de tal modo que es suficiente para reducir o agotar el número de células T clonales que expresan ya sea TRBC1 o TRBC2.

USO

La presente invención también proporciona un agente para su uso en el tratamiento de un linfoma de células T, de acuerdo con el método del primer aspecto. El agente puede ser cualquier agente, como se define arriba.

La presente invención también se relaciona con el uso de un agente, como se define arriba, en la producción de un medicamento para el tratamiento de un linfoma de células T, de acuerdo con el método del primer aspecto.

EQUIPO

La presente invención además proporciona un equipo que comprende un agente, como se define arriba, para su uso en el tratamiento de un linfoma de células T, de acuerdo con el método del primer aspecto.

El equipo también puede comprender uno o más reactivos adecuados para determinar la TRBC de una célula T maligna. Por ejemplo, el equipo puede comprender cebadores de PCR o un anticuerpo (anticuerpos) que son específicos para TRBC1 o TRBC2.

MÉTODO PARA DETERMINAR UN LINFOMA Y/O LEUCEMIA DE CÉLULAS T

La presente invención además se relaciona con un método para determinar la presencia de un linfoma o leucemia de células T en un sujeto, el cual comprende la etapa de determinar la proporción de células T en una muestra de un sujeto, las cuales son positivas a TRBC1 o TRBC2.

Los linfomas de células T implican la expansión clonal de células T malignas individuales. Como tal, la presencia de un linfoma de células T en un sujeto puede identificarse al determinar la proporción de células T TRBC1 o TRBC2 en una muestra derivada de un paciente.

La muestra puede ser una muestra de sangre periférica, una muestra de linfa o una muestra tomada directamente de un tumor, por ejemplo, una muestra de biopsia.

La proporción de células T totales que son positivas a TRBC1 o TRBC2, lo cual indica la presencia de un linfoma o leucemia de células T, puede ser, por ejemplo, de 80, 85, 90, 95, 98 o 99% de una población total de células.

El método puede implicar la determinación de la infiltración por una población distinta de células T en una biopsia o una muestra. En la presente, se indica la presencia de un linfoma o leucemia de células T, donde 80, 85, 90, 95, 98 o 99% de una población total de células T en la muestra es TRBC1 o TRBC2.

Las células T totales en una muestra pueden identificarse al determinar el número de células en la muestra que expresan CD3, CD4, CD8 y/o CD45. Una combinación de estos marcadores también puede utilizarse.

La proporción de células T totales en una muestra, las cuales expresan TRBC1 o TRBC2, puede determinarse al utilizar métodos que se conocen en la técnica, por ejemplo, citometría de flujo, inmunohistoquímica o microscopía fluorescente.

La invención se describirá ahora además por medio de Ejemplos, los cuales pretenden servir para ayudar a un experto en la técnica a llevar a cabo la invención y no se destinan en forma alguna a limitar el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Discriminación de células que expresan TRBC1 y TRBC2

El anticuerpo JOVI-1 se ha dado a conocer previamente por Viney *et al.* (Hybridoma; 1992; 11(6); 701- 713) y se encuentra disponible comercialmente (Abcam, ab5465).

- 5 Los presentes inventores determinaron que el JOVI-1 es capaz de discriminar células con base en la expresión específica de TRBC1 o TRBC2.

Los inventores generaron dos vectores tipo plásmido que suministran las regiones variables y constantes completas del TCR, que difieren sólo en la expresión de TRBC1 o TRBC2. Estos plásmidos se utilizaron para generar sobrenadante retroviral por la transfección transitoria de células 293T. Este sobrenadante se utilizó para transducir de modo estable células T Jurkat con eliminación de TCR (una línea celular de T-ALL con una mutación en el locus de cadena beta de TCR que impide la expresión de esta cadena y, en consecuencia, de todo el complejo TCR/CD3 de superficie). Esto tuvo como resultado la producción de líneas celulares que eran idénticas, excepto por la expresión de TRBC1 o TRBC2. La tinción de estas líneas celulares reveló la expresión completa del complejo TCR/CD3 de superficie, y que sólo las células que expresaban TRBC1 se tiñeron con el anticuerpo JOVI-1 (Figura 4).

20

Ejemplo 2 – Las células T CD4+ y CD8+ de donadores normales contienen poblaciones separadas positivas a TRBC1 y negativas a TRBC1

Los inventores probaron el anticuerpo JOVI-1 en células T humanas primarias de donadores normales. Estos análisis revelaron que todos los donadores tenían una proporción de células T CD4+ y CD8+ que expresaban TRBC1, y una proporción de cada una que no. Aproximadamente 20 a 50% de las células T normales CD4+ y CD8+ son TRBC1 +ve (Figuras 6 y 7).

25

Ejemplo 3 – Las líneas de células T clonales que expresan TCR son positivas o negativas a TRBC1

30

Las líneas celulares se derivan de una población tumoral clonal original en un paciente. La tinción de las líneas de células T que expresan TCR revela que las células T expresan TRBC1 o TRBC2, lo que confirma a este como marcador de clonalidad. De tres líneas de células T probadas, las células Jurkat (conocidas por ser TRBC1+), y no las células HPB-ALL o HD-Mar-2 (conocidas por ser TRBC2+), se tiñen con JOVI-1, lo que soporta la expresión exclusiva de TRBC1 o 2 (Figura 8).

35

Ejemplo 4 – Las células T clonales primarias en pacientes con leucemia prolinfocítica T son positivas o negativas a TRBC1

Las células T clonales, extraídas a partir de sangre periférica de pacientes con leucemia prolinfocítica T (T-PLL), son positivas a TRBC1 o negativas a TRBC1 en modo uniforme.

Ejemplo 5 - Efecto de la mutación de los residuos que son únicos para TCBC1

Se generaron vectores tipo plásmido, que codifican TCR que son idénticos, excepto por mutaciones híbridas TRBC1/2 en la región constante de cadena β del TCR. El análisis mostró que JOVI-1 reconoce diferencias en los residuos en las posiciones 3 y 4 de la cadena constante β del TCR, lo que indica que estos residuos se encuentran accesibles para el reconocimiento de anticuerpos y probablemente son los mejores objetivos para generar agentes que discriminan a TRBC1 de TRBC2 o a TRBC2 de TRBC1 (Figura 5).

Ejemplo 6 – Lisis específica de células T que expresan TRBC1, pero no TRBC2, del TCR.

Células T Jurkat de tipo silvestre (CD34-, TRBC1+) se mezclaron con células T Jurkat con eliminación de TCR $\alpha\beta$ transducidas con TRBC2, coexpresado con el gen marcador CD34 (CD34+TRBC2+). Estas células se incubaron con JOVI-1 solo, o se incubaron con JOVI-1 y complemento por 1 hora. Las células se lavaron y tiñeron para CD34, Anexina V y 7-AAD. Las células se analizaron por citometría de flujo.

La expresión de CD34 en la población viva, como se define por la población negativa para Anexina-V y débil para 7AAD, se muestra en la Figura 9. Se observó eliminación selectiva de células T TRBC1 (CD34-) (Figura 9).

Las células T Jurkat de tipo silvestre son TRBC1+ por naturaleza y no expresan el gen marcador CD34 truncado. Como se describe arriba, los inventores derivaron una línea Jurkat TRBC2+ al transducir células T Jurkat con eliminación de TCR $\alpha\beta$ con un vector retroviral que codifica un TRBC2 TCR, así como el gen marcador CD34 truncado. Estas células T luego se mezclaron en conjunto. Después, los inventores incubaron las células T con JOVI-1 solo o con JOVI-1 y complemento por 1 hora. Convenientemente, los inventores pudieron discriminar a TRBC1 y 2 poblaciones al teñir para el gen marcador CD34 y, de esta manera, evitaron fallar en detectar a los TRBC1 TCR debido a la internación del TCR después de la exposición prolongada al mAb anti-TCR. Las células se lavaron y tiñeron para CD34, Anexina V y 7-AAD. Las

células se analizaron por citometría de flujo. Al activar células vivas (es decir, células que eran negativas a Anexina V y débiles para 7-AAD), los inventores pudieron determinar que las células T TRBC1 se eliminaron selectivamente por JOVI-1 en presencia del complemento (Figura 9).

5

Ejemplo 7 - Las células T, específicas para el Virus de Epstein Barr (EBV) policlonal, pueden dividirse en dos poblaciones TRBC1/2 aproximadamente iguales.

Se extrajeron células T de sangre periférica a partir de un donador de sangre normal.

10 Se aislaron células mononucleares y la mayor parte de las células se crioconservó. Un pequeño número de células se infectó con una cepa de laboratorio de EBV (B95-8). A lo largo de algunas semanas, emergió una línea celular inmortalizada infectada con EBV, conocida como línea celular linfoblastoide (LCL). Se sabe que esta línea celular se conoce presenta una gran colección de diferentes antígenos de EBV. Las

15 células mononucleares previamente crioconservadas se descongelaron y se estimularon repetidamente con esta línea LCL semanalmente por 4 semanas en presencia de IL2. Este proceso expande selectivamente las células T específicas de EBV a partir de la población mononuclear de sangre periférica. También se sabe que este proceso tiene como resultado una línea policlonal donde >90% de las células T

20 son específicas de EBV y representa el sistema inmune para EBV del donador. La especificidad de esta línea se comprueba al mostrar un alto grado de eliminación de LCL autólogas, pero no LCL alogénicas o células K562 (Figura 10a). Esta línea celular luego se tiñó con JOVI-1 y se demostró que contenía una mezcla aproximadamente igual de células T TRBC1 y TRBC2 (Figura 10b).

25

De esta manera, si se administró un agente terapéutico que agotó el compartimiento TRBC1 o TRBC2, una adecuada inmunidad para EBV podría permanecer. Dado que la inmunidad para EBV se considera como sistema modelo para una respuesta inmune, es razonable postular que la inmunidad para otros patógenos podría

30 conservarse de igual modo.

Ejemplo 8 - Tinción por JOV1 de un linfoma circulante de células T periféricas.

La hipótesis era que los linfomas de células T, al ser clonales, podrían expresar receptores de células T TRB1 o TRBC2, mientras las células T normales, al ser

35 policlonales, podrían comprenderse de una población de células T que son una mezcla de las que tienen TRBC1 o TRBC2. Para demostrar esto, se obtuvo una muestra de sangre de un linfoma de células T de un paciente cuyo linfoma estaba

circulando en sangre periférica. Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron y tiñeron con un panel de anticuerpos que incluyó CD5 y JOVI-1. La población total de células T (que contiene células T de linfoma y normales) se identificó primero. Esta población se comprendió de células T con expresión normal (brillante) de CD5 y células T con expresión intermedia/débil de CD5. Las primeras

representan células T normales, mientras las últimas representan el linfoma. La unión de JOVI-1 se investigó después, y los resultados se muestran en la Figura 12.

Las poblaciones intermedias y débiles para CD5 (el tumor) fueron en su totalidad positivas a TRBC2.

Ejemplo 9 - Dilucidación de las secuencias de VH/VL de JOVI-1

Al utilizar 5' RACE con cebadores que se alinean por temperatura a las regiones constantes de IgG CH1 de ratón y la región constante de kappa de ratón, se aisló una sola secuencia de VH funcional y una sola secuencia de VL funcional a partir del JOVI-1 de hibridoma. Las secuencias de VH y VL son las SEQ ID 1 y 2 respectivamente (ver arriba). Una secuencia acotada de VH y VL se muestra en la Figura 11.

Estas secuencias de VH y VL se clonaron nuevamente en marco con mouse cadena pesada de IgG y cadena ligera kappa, respectivamente. Además, la VH y VL se fusionaron para formar un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), y este se fusionó a la región de bisagra-CH2-CH3 de IgG2a de ratón para crear un scFv-Fv. La secuencia de aminoácidos del scFv se determina en la Descripción Detallada como SEQ ID No. 3. Se generaron anticuerpos recombinantes y scFv-Fc recombinante por la transfección a células 293T. En conjunto con el JOVI-1 del hibridoma, se tiñeron las siguientes células: Células Jurkat con TCR eliminado, células Jurkat de tipo silvestre, células Jurkat con eliminación de TCR transducidas con TRBC1 coexpresado con eBFP2, y células Jurkat con eliminación de TCR transducidas con TRBC2 coexpresado con eBFP2. El anticuerpo recombinante y scFv-Fc derivado de JOVI se unieron a TRBC2, lo que confirma que se había identificado la VH/VL correcta, y que JOVI-1 VH/VL puede plegarse como scFv. Estos datos de unión se muestran en la Figura 13.

Ejemplo 10 - Función del CAR basado en JOVI-1

El scFv de JOVI-1 se clonó en formatos de CAR. Para dilucidar qué longitud de espaciador resultaría en el CAR basado en JOVI-1 óptimo, se generaron CAR de 3ª generación con un espaciador de Fc humano, un espaciador de tallo de CD8 humano

o con un espaciador derivado de una bisagra de IgG1 (Figura 4). Células T humanas primarias de donadores normales se transdujeron con estos CAR y se comparó la eliminación de las células Jurkat y células Jurkat con TCR eliminado. Los CAR con scFv de JOVI-1 que tenían un espaciador de bisagra de IgG1 o un espaciador de tallo de CD8 eliminaron células Jurkat, pero no células Jurkat con TCR eliminado (Figura 5), lo que demuestra la especificidad esperada. Dado que las células T donadoras normales transducidas con los CAR tendrían una mezcla de células T TRB1/2, se esperaba que los cultivos pudieran “autopurgarse”. En efecto, esto se observó. La tinción con JOVI-1 de los cultivos de células T con CAR que se volvieron 100% negativos a TRBC2 se muestra en la Figura 6.

MATERIALES Y MÉTODOS

DEMONSTRACIÓN DE ESPECIFICIDAD DE JOVI-1

Se generó un casete retroviral tricistrónico que codificaba un TCR humano bien caracterizado, así como un gen marcador conveniente. Las secuencias codificantes para las cadenas TCR α y β se generaron al utilizar síntesis génica *de novo* a partir de oligonucleótidos superpuestos. Estas cadenas se conectaron en marco a un péptido de fiebre aftosa 2A para permitir la coexpresión. El gen marcador CD34 truncado se clonó a partir de cDNA por PCR y se coexpresó con las cadenas TCR al utilizar una secuencia interna de entrada a ribosomas (IRES). Este casete se introdujo en un vector retroviral. Variantes de esta construcción se generaron por empalme por PCR superpuesto con cebadores que introdujeron las mutaciones deseadas. La veracidad de las construcciones se confirmó por secuenciación de Sanger. La línea Jurkat 76 es un derivado bien caracterizado de la línea de células T Jurkat que tiene ambas cadenas TCR α y β eliminadas. Esta línea Jurkat se transdujo con los vectores retrovirales anteriores al utilizar técnicas estándar.

TINCIÓN Y ANÁLISIS DE CÉLULAS JURKAT, CÉLULAS T DE SANGRE PERIFÉRICA Y LÍNEAS CELULARES

Las células Jurkat se obtuvieron a partir de ECACC y se diseñaron como se detalla arriba. Otras líneas de células T también se obtuvieron de ECACC. Se extrajo sangre periférica por venopunción de donadores normales. La sangre se guardó en ficoll para aislar las células mononucleares. Las células se tiñeron con JOVI-1 así como anticuerpos monoclonales comercialmente disponibles que reconocen todos los TCR y CD3. En el caso de células T diseñadas, las células se tiñeron con anticuerpos que reconocen a CD34. En el caso de células mononucleares de sangre periférica, las

células se tiñeron con anticuerpos que reconocen a CD4 y CD8. Los anticuerpos se adquirieron conjugados con fluoróforos adecuados a fin de que pudieran obtenerse señales fluorescentes independientes mientras se analizaban las células con un citómetro de flujo.

5

DEMONSTRACIÓN DE LISIS ESPECÍFICA DE CÉLULAS T TRBC1

Células T Jurkat de tipo silvestre (TRBC1 – TCR), y células T Jurkat TCR KO con TRBC2 TCR introducido se mezclaron en conjunto a una relación 1:1. Esta mezcla de células Jurkat luego se incubó con anticuerpo monoclonal JOVI-1 a 1 µg/ml en
10 ausencia o presencia de complemento. Cuatro horas después, las células se tiñeron con Anexina-V y 7AAD, y CD34. Convenientemente, el gen marcador CD34 puede distinguir entre células Jurkat de tipo silvestre (TRBC1) y transgénicas (TRBC2). Las poblaciones de células se analizaron por citometría de flujo. Las células vivas se estudiaron selectivamente al activar eventos citométricos de flujo que son negativos
15 para Anexina-V y débiles para 7AAD. En esta forma, se estudió la supervivencia de células T transgénicas (TRBC2) vs de tipo silvestre (TRBC1).

Ejemplo 11 – Investigación de la clonalidad de trastornos linfoproliferativos de células T

20 Cuatro pacientes, tres con trastorno linfoproliferativo de linfocitos granulares grandes y células T (T-LGL), y uno con linfoma de células T periféricas (PCTL) se probaron para confirmar que las células malignas eran positivas o negativas a TRBC1 en modo uniforme.

25 Sangre completa o médula ósea se recolectó a partir de pacientes con trastornos linfoproliferativos de células T. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron por centrifugación en gradientes de Ficoll. Las PBMC recién obtenidas se sedimentaron y tiñeron por 20 minutos con anticuerpos preconjugados apropiados. Las células luego se lavaron y resuspendieron en solución salina
30 regulada de fosfatos para un inmediato análisis citométrico de flujo en BD LSR Fortessa II. Los linfocitos vivos se identificaron por propiedades de FSc/SSc y la falla para captar un colorante discriminador de células muertas. Las células T se identificaron por tinción con anticuerpo anti-TCR alfa/beta. Las poblaciones de células T tumorales y normales se identificaron al utilizar tinciones apropiadas de
35 superficie celular para cada muestra, con base en el inmunofenotipo previamente identificado por análisis de laboratorio clínico.

Los resultados se muestran en las Figuras 18 a 21.

En el paciente A (T-LGL, Figura 18), las células T normales fueron brillantes para CD7 y contenían células mixtas CD4/CD8, y una población mixta de células TRBC1 o TRBC1. En contraste, las células malignas fueron débiles para CD7 o CD7, fueron CD8+CD4- en modo uniforme, y fueron TRBC1- en modo uniforme.

En el paciente B (T-LGL, Figura 19), las células malignas se identificaron por CD4-, CD8+, CD7+ CD57+ y fueron TRBC1- en forma clonal (panel resaltado). Las células T normales CD4+CD8- y CD4-CD8+ contenían poblaciones TRBC1+ y TRBC1-.

En el paciente C (T-LGL, Figura 20), las poblaciones de células T normales CD4+ y CD8+ fueron 30 a 40% TRBC1+. Las células malignas se identificaron por CD4-, CD8+, CD7+ CD57+ y fueron TRBC1+ en forma clonal (panel resaltado, obsérvese que 84% de las células son TRBC1 – el restante 16% probablemente son células T ‘normales’ contaminantes). Las células T normales CD4+CD8- y CD4-CD8+ contenían poblaciones TRBC1+ y TRBC1-.

En el paciente D (PTCL-NOS, Figura 21), las células malignas en la médula ósea, identificadas con base en FSC alto CD5 débil CD4 débil, fueron TRBC1+ en modo uniforme, en tanto que las células T CD4+CD8- y CD4-CD8+ contenían poblaciones TRBC1+ y TRBC1-.

Ejemplo 12 - Generación de anticuerpos monoclonales humanos que distinguen entre las dos isoformas del dominio constante de cadena β del receptor de células T, al utilizar expresión en fagos

Con el fin de generar anticuerpos que distinguieran entre TRBC2 y TRBC1, se sintetizaron fragmentos peptídicos que cubren la región de diferencia entre las dos isoformas TRBC. De las cuatro diferencias de aminoácidos entre TRBC2 y TRBC1, dos se encuentran al principio de los dominios constantes. Los péptidos (ver a continuación) que representan estas regiones se sintetizaron y utilizaron para la generación de anticuerpos.

TRBC2 VLEDLKNVFPPEVAV (SEQ ID No. 36)

TRBC1 VLEDLNKVPPEVAV (SEQ ID No. 37)

Estos péptidos se prepararon en formas modificadas biotiniladas, no biotiniladas y con cisteína (por la adición de una cisteína C terminal). Las formas modificadas con cisteína de TRBC1 y TRBC2 se conjugaron subsecuentemente a albúmina sérica bovina modificada (Imm-Link BSA, Innova 462-001) u ovoalbúmina (Imm-Link Ovalbumin, Innova 461-001) de acuerdo con las condiciones recomendadas de los fabricantes.

Resultados

Selecciones de expresión en fagos de anticuerpos

- Se construyó una biblioteca humana de expresión en fagos y se llevaron a cabo selecciones de fagos como se describe en Schofield et al., 2007 Genome Biol 8, R254. Con el fin de identificar anticuerpos específicos para TRBC1 y TRBC2 a partir de la biblioteca de anticuerpos, se llevaron a cabo múltiples rondas de selecciones de expresión en fagos. Dos estrategias de selección de fagos se utilizaron en paralelo para maximizar la oportunidad de generar un panel grande de agentes de unión específicos. Estas estrategias se conocen como selecciones en fase sólida y en fase en solución (Figura 21). En las selecciones en fase sólida, los anticuerpos en fagos se dejan unirse al antígeno objetivo inmovilizado en una superficie sólida (Schofield et al., 2007, como arriba). En las selecciones en fase en solución, los anticuerpos en fagos se unen al antígeno biotinilado en solución y el complejo anticuerpo en fago-antígeno entonces se captura por perlas paramagnéticas recubiertas con estreptoavidina o neutravidina. Dentro de la estrategia de selección en fase sólida, se emplearon dos diferentes estrategias de inmovilización o presentación de antígenos. Al utilizar la primera estrategia, péptidos TRBC conjugados a albúmina sérica bovina (BSA) u ovoalbúmina (OA) se inmovilizaron en inmuntubos Maxisorp™ mediante adsorción directa. Al utilizar la segunda estrategia, los péptidos TRBC biotinilados se inmovilizaron indirectamente en inmuntubos Maxisorp™ que se prerrecubrieron con estreptoavidina o neutravidina.
- Con el fin de seleccionar anticuerpos que fueran específicos para el péptido deseado, todas las selecciones se llevaron a cabo en presencia de un exceso del péptido opuesto. Por ejemplo, todas las selecciones de TRBC1 se llevaron a cabo en presencia de un exceso molar de 10 veces de TRBC2 no biotinilada. Este método se conoce como 'deselección' y se esperaba que agotara los anticuerpos que reconocen epítomos compartidos en ambos péptidos TRBC dado que estos se unen preferentemente al exceso de TRBC2 en solución. Con el fin de evitar enriquecer clones de anticuerpos que se unen a la proteína portadora (BSA u OA) o el socio de

inmovilización (estreptoavidina o neutravidina de Thermo fisher scientific) se emplearon dos estrategias en combinación.

La primera estrategia fue conmutar el socio de conjugación o inmovilización entre las rondas de selección. Para los péptidos directamente inmovilizados, la primera ronda de selecciones se llevó a cabo en BSA-péptido y para la ronda 2 se utilizó conjugado OA-péptido. De igual forma, los péptidos TRBC biotinilados se inmovilizaron en estreptoavidina para la ronda 1 y se utilizó neutravidina para la inmovilización en la ronda 2.

La segunda estrategia fue agotar la biblioteca en fagos de cualquier agente de unión al socios de conjugación/inmovilización al realizar una 'deselección' en la ronda 1. For los péptidos directamente inmovilizados, la 'deselección' se realizó al llevar a cabo la etapa de unión fago-péptido en presencia de un exceso molar de 10 veces de BSA libre en solución. En el caso de péptidos biotinilados, inmovilizados en estreptoavidina, la biblioteca en fagos se preincubó con perlas paramagnéticas recubiertas con estreptoavidina. Las perlas se removieron antes de la adición del fago a tubos de antígeno, lo que en consecuencia limita la entrada de agentes de unión de estreptoavidina a la selección. Las diferentes condiciones de selección utilizadas se resumen en la Figura 21. Ver Tabla 3 para información detallada sobre las condiciones de selección.

Un fago policlonal, preparado a partir de la selección producida en la ronda 2, se probó en ELISA al utilizar diversas presentaciones de los péptidos o las proteínas de soporte. Esto incluyó péptidos TRBC directamente inmovilizados como conjugados de BSA o OA, o péptidos biotinilados inmovilizados indirectamente en estreptoavidina o neutravidina. Las proteínas de control incluidas fueron estreptoavidina, neutravidina, BSA y un antígeno irrelevante. La unión del fago se detectó al utilizar un anticuerpo anti-M13 de ratón (GE healthcare) seguido por un anticuerpo anti-Fc de ratón etiquetado con europio (Perkin Elmers) al utilizar fluorescencia de resolución temporal (Figura 22). Este resultado demostró la unión preferencial de poblaciones de fagos policlonales al péptido TRBC respectivo (en comparación con el péptido TRBC opuesto). Por ejemplo, el fago policlonal preparado a partir de selecciones de TRBC1 mostró una señal de unión significativamente superior para TRBC1 que para TRBC2 y viceversa. Hubo una unión limitada o ninguna a los socios de inmovilización o conjugación y el antígeno irrelevante.

Subclonación y análisis selectivo monoclonal de anticuerpos de cadena sencilla (scFv)

Las poblaciones de scFv de las selecciones producidas en la ronda 2 y ronda 3 se subclonaron en el vector de expresión pSANG10-3F y se transformaron en células de *E. coli* BL21 (DE3). Un total de 1128 transformantes individuales (564 clones/péptido TRBC) se recogieron en placas de cultivo de 12 x 96 pozos (94 clones/placa) y la expresión de anticuerpos se indujo al utilizar medios de autoinducción. Los anticuerpos monoclonales recombinantes secretados en el sobrenadante de cultivo después de una inducción durante la noche se probaron para su unión a TRBC1 y TRBC2 biotinilados inmovilizados en placas de 96 pozos Nunc Maxisorp™ recubiertas con neutravidina. De los 564 clones analizados selectivamente de las selecciones de TRBC1, se encontró que 255 clones eran específicos para TRBC1 (>10000 unidades TRF para TRBC1 y <1000 unidades TRF para TRBC2). Un total de 138 agentes de unión específicos de TRBC2 (>10000 unidades TRF para TRBC2 y <2000 unidades TRF para TRBC1) se identificaron a partir de los 564 clones analizados selectivamente de las selecciones de TRBC2. La Figura 24 muestra un perfil de unión representativo de una sola placa de 96 pozos que surge de la selección en TRBC1 (Figura 24A) o TRBC2 (Figura 24B). Los detalles de los agentes de unión específicos generados al utilizar diferentes condiciones de selección se resumen en la Tabla 5.

Un total de 142 y 138 agentes de unión específicos se recogieron a partir de las selecciones de TRBC1 y TRBC2 respectivamente para el análisis de secuencias y caracterización posterior. Las secuencias de clones elegidos al gusto se generaron por secuenciación de Sanger al utilizar el equipo BigDye® terminator v3.1 cycle sequencing (Life technologies). Las secuencias de DNA se analizaron para determinar la secuencia de proteínas, y las CDR de los dominios VH y VL se identificaron. El análisis de las regiones CDR3 de VH y VL identificó 74 clones TRBC1 únicos y 42 TRBC2 únicos (donde único se define como cualquier combinación de las secuencias CDR3 de VH y CDR3 de VL). Los clones específicos de TRBC1 y sus secuencias de CDR3 de VH y CDR3 de VL se resumen en la Tabla 1 arriba. Los clones específicos de TRBC2 y sus secuencias de CDR3 de VH y CDR3 de VL se resumen en la Tabla 2 arriba.

Tabla 3A. Detalles de las selecciones de TRBC en fase sólida

Selecciones en fase sólida

Antígeno de selección	No. de rondas	Concentración de antígeno	Inmovilización	Antígenos de selección de ronda 1	Antígenos de selección de ronda 2
BSA TRBC1 (ronda 1), OA TRBC1 (ronda 2)	2	10 µg/ml	Directa	BSA (100 µg/ml), TRBC2 (30 µM)	TRBC2 (30 µM)
BSA TRBC2 (ronda 1), OA TRBC2 (ronda 2)	2	10 µg/ml	Directa	BSA (100 µg/ml), TRBC1 (30 µM)	TRBC1 (30 µM)
Bio-TRBC1 (ronda 1 y 2)	2	3 µg/ml	Perlas de estreptoavidina (ronda 1), Neutravidina (ronda 2)	Perlas de estreptoavidina, TRBC2 (30 µg/ml)	Perlas de neutravidina, TRBC2 (30 µg/ml)
Bio-TRBC2 (ronda 1 y 2)	2	3 µg/ml	Perlas de estreptoavidina (ronda 1), Neutravidina (ronda 2)	Perlas de estreptoavidina, TRBC1 (30 µg/ml)	Perlas de neutravidina, TRBC1 (30 µg/ml)

Tabla 3B. Detalles de las selecciones de TRBC en fase en solución

Selecciones en fase en solución					
Antígeno de selección	No. de rondas	Concentración de antígeno	Antígenos de selección de ronda 1	Antígenos de selección de ronda 2	Antígenos de selección de ronda 3
Bio-TRBC1 (ronda 1,2 y 3)	3	500 nM	Perlas de estreptoavidina, TRBC2 (5 µM)	Perlas de estreptoavidina, TRBC2 (5 µM)	Perlas de neutravidina, TRBC2 (5 µM)
Bio-TRBC2 (ronda 1,2 y 3)	3	500 nM	Perlas de estreptoavidina, TRBC1 (5 µM)	Perlas de estreptoavidina, TRBC1	Perlas de neutravidina, TRBC1

				(5 μ M)	(5 μ M)
--	--	--	--	-------------	-------------

Tabla 4: Cifras producidas de selección

Tipo de selección	No. de rondas	Antígeno	No. de unidades formadoras de placa (ronda 1)	No. de unidades formadoras de placa (ronda 2)	No. de unidades formadoras de placa (ronda 3)
Fase sólida	2	BSA/OA TRBC1	1.0×10^4	6.0×10^5	N.D.
Fase sólida	2	BSA/OA TRBC2	1.5×10^3	2.2×10^6	N.D.
Fase sólida	2	Bio-TRBC1	5.0×10^3	2.0×10^5	N.D.
Fase sólida	2	Bio-TRBC2	3.0×10^3	1.0×10^4	N.D.
Fase en solución	3	Bio-TRBC1	1.5×10^6	$>10^8$	$>10^8$
Fase en solución	3	Bio-TRBC2	2.7×10^5	$>10^8$	$>10^8$

5

Tabla 5: Detalles de análisis selectivo monoclonal

Número de selección	Tipo de selección	Antígeno de selección	Producción de selección	No. de clones analizados selectivamente	No. de agentes de unión específicos
262	Fase sólida, inmovilización indirecta	TRBC1	Ronda 2	186	93
263	Fase sólida, inmovilización indirecta	TRBC2	Ronda 2	186	68

264	Fase en solución	TRBC1	Ronda 2	186	83
265	Fase en solución	TRBC2	Ronda 2	186	29
266	Fase en solución	TRBC1	Ronda 3	94	47
267	Fase en solución	TRBC2	Ronda 3	94	33
268	Fase sólida, inmovilización directa (BSA/OA)	TRBC1	Ronda 2	94	32
269	Fase sólida, inmovilización directa (BSA/OA)	TRBC2	Ronda 2	94	9

Ejemplo 13 – Producción de anticuerpos policlonales para TRBC mediante inmunización peptídica de conejos

Con el fin de generar anticuerpos que distingan entre TRBC2 y TRBC1, 2 péptidos que cubren el área del principio de diferenciación entre las dos isoformas de TRBC se sintetizaron y utilizaron para la inmunización de conejos. Las siguientes secuencias peptídicas se utilizaron:

TRBC1: VLEDLNKVPPEVAVC (SEQ ID No. 38)

TRBC2: VLEDLKNVPPEVAVC (SEQ ID No. 39).

Se sintetizó un total de 15 mg de péptidos TRBC1 y TRBC2. Hemocianina de lapa californiana se conjugó a los péptidos TRBC1 y TRBC2 mediante las cisteínas C terminales presentes en los péptidos. Para cada péptido, 2 conejos New England se inmunizaron un total de tres veces con péptido TRBC1 o TRBC2 conjugado a KLH. Después de la tercera inmunización, los conejos se sacrificaron y se sangraron, y el suero se recolectó para su purificación. El suero sin purificar obtenido de los conejos se hizo pasar a través de una columna de resina de agarosa con perlas reticuladas acoplada con el péptido utilizado para inmunización, para recolectar anticuerpos específicos para los segmentos comunes y el epítipo específico de la isoforma TRBC del péptido. El sobrenadante purificado inicialmente luego se purificó además a través de una columna con el péptido alternativo inmovilizado, para remover los anticuerpos específicos para segmentos comunes del péptido.

Configuración de ELISA

Antígeno o antígenos de recubrimiento: A : péptido TRBC1

B : péptido TRBC2

Concentración de recubrimiento: 4 µg/ml, 100 µl/pozo

Regulador de recubrimiento: Solución salina regulada de fosfatos, pH 7.4

5 Anticuerpo secundario: IgG Anti-CONEJO (H&L) (CABRA) Anticuerpo
Conjugado con Peroxidasa

Los resultados se muestran en las Figuras 25 y 26. Es posible elaborar suero
policlonal que comprende anticuerpos específicos para TRBC1 o TRBC2 por este
10 método.

REIVINDICACIONES

1. Un receptor antigénico quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígenos, el cual se une selectivamente a la región constante del TCR beta 1 (TRBC1) o TRBC2.
5
2. El CAR de conformidad con la reivindicación 1, que se une selectivamente a TRBC1.
- 10 3. El CAR de conformidad con la reivindicación 2, en donde el dominio de unión a antígenos tiene una cadena pesada variable (VH) y una cadena ligera variable (VL), las cuales comprenden las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR):
CDR1 de VH: SEQ ID No. 7;
15 CDR2 de VH: SEQ ID No. 8;
CDR3 de VH: SEQ ID No. 9;
CDR1 de VL: SEQ ID No. 10;
CDR2 de VL: SEQ ID No. 11; y
CDR3 de VL: SEQ ID No. 12.
20
4. El CAR de conformidad con la reivindicación 2, en donde el dominio de unión a antígenos comprende una cadena pesada variable (VH) que tiene la secuencia mostrada como SEQ ID No. 1, y una cadena ligera variable (VL) que tiene la secuencia mostrada como SEQ ID No. 2.
25
5. El CAR de conformidad con la reivindicación 2, en donde el dominio de unión a antígenos comprende un scFv que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 3.
- 30 6. El CAR de conformidad con la reivindicación 2, el cual comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID No. 4, 5 y 6
7. El CAR de conformidad con la reivindicación 1, que se une selectivamente a TRBC2.
35
8. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.

9. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8.

5 10. Una célula que comprende un CAR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

11. La célula T de conformidad con la reivindicación 10.

10 12. Un método para producir una célula de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, el cual comprende la etapa de transducir o transfectar una célula con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, o un vector de acuerdo con la reivindicación 9.

15 13. La célula de conformidad con la reivindicación 10 u 11 para su uso en un método para tratar un linfoma o leucemia de células T en un sujeto, el cual comprende la etapa de administrar la célula que comprende el CAR selectivo para TCRB1 o TCRB2 al sujeto, para dar lugar al agotamiento selectivo de las células T malignas, en conjunto con células T normales que expresan la misma
20 TRBC que las células T malignas, pero no para dar lugar al agotamiento de células T normales que expresan la TRBC no expresada por las células T malignas.

14. Una célula para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el método también comprende la etapa de investigar la región constante del TCR beta
25 (TCRB) de una célula T maligna del sujeto, para determinar si expresa TRBC1 o TRBC2.

15. Una célula para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en donde el linfoma o leucemia de células T se selecciona a partir de linfoma de células T
30 periféricas no especificado de otro modo (PTCL-NOS), linfoma angioinmunoblástico de células T (AITL), linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), linfoma de células T asociado a enteropatía (EATL), linfoma hepatoesplénico de células T (HSTL), linfoma extranodal de células T/NK de tipo nasal, linfoma cutáneo de células T, ALCL cutáneo primario, leucemia prolinfocítica de células T y leucemia linfoblástica aguda
35 de células T.

16. Un método para diagnosticar un linfoma o leucemia de células T en un sujeto,

el cual comprende la etapa de determinar el porcentaje de células T totales, en una muestra aislada del sujeto, las cuales son positivas a TRBC1 o TRBC2.

17. El método de conformidad con la reivindicación 16, en donde un porcentaje
5 de células T positivas a TRBC1 o TRBC2, el cual es mayor a aproximadamente 80%, indica la presencia de un linfoma o leucemia de células T.

18. El método de conformidad con la reivindicación 16 o 17, en donde la muestra
10 es una muestra de sangre periférica o una biopsia.

19. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en
donde las células T totales se identifican o se aíslan a partir de la muestra al utilizar
un agente que se une a CD3.

15

RESUMEN

La presente invención se relaciona con un receptor antigénico quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígenos el cual se une selectivamente a la
5 región constante del TCR beta 1 (TRBC1) o TRBC2, células, células T que comprenden el CAR, y el uso de estas células para el tratamiento de un linfoma o leucemia de células T en un sujeto.

10

15

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO
(Segundo Examen de Fondo)

1. Un receptor antigénico quimérico (CAR) que comprende:
 - i) un dominio de unión a antígenos,
 - ii) un espaciador,
 - iii) un dominio transmembranal, y
 - iv) un endodominio,caracterizado porque el dominio de unión a antígenos se une selectivamente a la región constante del TCR beta 1 (TRBC1) y en donde el dominio de unión a antígenos tiene una cadena pesada variable (VH) y una cadena ligera variable (VL), las cuales comprenden las siguientes regiones determinantes de complementariedad (CDRs):

CDR1 de VH: SEQ ID NO.: 7;

CDR2 de VH: SEQ ID NO.: 8;

CDR3 de VH: SEQ ID NO.: 9;

CDR1 de VL: SEQ ID NO.: 10;

CDR2 de VL: SEQ ID NO.: 11; y

CDR3 de VL: SEQ ID NO.: 12.
2. Un CAR de conformidad con la Reivindicación 1, en donde el dominio de unión a antígenos comprende una cadena pesada variable (VH) que tiene la secuencia mostrada como SEQ ID No. 1 y una cadena ligera variable (VL) que tiene la secuencia mostrada como SEQ ID No. 2.
3. Un CAR de conformidad con la Reivindicación 1, en donde el dominio de unión a antígenos comprende un scFv que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 3.
4. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
5. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de conformidad con la Reivindicación 4.
6. Una célula T o célula NK que comprende una secuencia de ácido nucleico de conformidad con la Reivindicación 4 o un vector de conformidad con la Reivindicación 5.

7. Un método para producir una célula de conformidad con la Reivindicación 6, el cual comprende la etapa de transducir o transfectar una célula con una secuencia de ácido nucleico de conformidad con la Reivindicación 4, o un vector de conformidad con la Reivindicación 5.
8. Un método *in vitro* para diagnosticar un linfoma o leucemia de células T, el cual comprende la etapa de determinar el porcentaje de células T totales, en una muestra aislada de un sujeto, las cuales son positivas a TRBC1 o TRBC2.
9. El método de conformidad con la Reivindicación 8, en donde un porcentaje de células T positivas a TRBC1 o TRBC2, el cual es mayor al 80%, indica la presencia de un linfoma o leucemia de células T.
10. El método de conformidad con la Reivindicación 8 o 9, en donde la muestra es una muestra de sangre periférica o una biopsia.
11. El método de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 10, en donde las células T totales se identifican o se aíslan a partir de la muestra al utilizar un agente que se une a CD3.

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: Expediente No. NC2016/0001569

Solicitud de Patente de Invención titulada: “RECEPTOR ANTIGÉNICO QUIMÉRICO (CAR) CON DOMINIOS DE UNIÓN A ANTÍGENO A LA REGIÓN CONSTANTE DEL RECEPTOR DE CÉLULAS T BETA”

Solicitante: UCL BUSINESS PCL

Nuestra Ref.: P2016/000135

RESPUESTA AL OFICIO No. 12156, NOTIFICADO EL 09 DE OCTUBRE DE 2018
(SEGUNDO EXAMEN DE FONDO)

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal de prórroga previsto en el artículo 45 de la Decisión 486, en los siguientes términos:

1. a- En primer lugar, con el ánimo de brindar mayor claridad a la materia reivindicada, me permito presentar un **Capítulo Reivindicatorio Modificado**, que reemplaza en su totalidad al Capítulo Reivindicatorio presentado en respuesta al examen de fondo el 20 de septiembre de 2018. Así, en el Capítulo Reivindicatorio Modificado se introdujeron los siguientes cambios:

- se eliminan las Reivindicaciones 2, 5 a 7, y 11;
- se modifica la Reivindicación 1 de manera que ahora comprende las características estructurales definidas en la antigua Reivindicación 2;
- las nuevas Reivindicaciones 2 a 5 y 6 a 10 corresponden a las antiguas Reivindicaciones 3 a 10 y 12 a 16, respectivamente;
- la nueva Reivindicación 6 (antigua Reivindicación 10) ahora está limitada a células T o células NK;
- se elimina la expresión “aproximadamente” de la nueva Reivindicación 9 (antigua Reivindicación 14);

- las dependencias de las reivindicaciones se adecuan de acuerdo a la nueva numeración.

b- Asimismo, también me permito presentar un **Capítulo Descriptivo Modificado**, en el cual únicamente se reeditaron las Tablas 1 y 2 en las páginas 18 y 23 del Capítulo Descriptivo para facilitar su lectura.

Valga anotar que las modificaciones efectuadas en el Capítulo Reivindicatorio cumplen a cabalidad con lo estipulado en el Artículo 34 de la Decisión 486, ya que éstas de ninguna manera implican una ampliación de la protección correspondiente a la divulgación contenida en la solicitud original.

2. a- La Examinadora eleva las siguientes objeciones respecto al Capítulo Reivindicatorio y Capítulo Descriptivo:

- las Reivindicación 1 no es concisa ni se encuentra sustentada en el Capítulo Descriptivo, ya que se refieren a un receptor de antígeno quimérico (CAR) que no está definido mediante ninguna característica estructural, como la secuencia de aminoácidos de la receptor CAR completo o del dominio de unión que le confiere especificidad al TCRBC1; por lo que la reivindicación se refiere a cualquier molécula CAR de unión al antígeno TCRB1;
- las Reivindicaciones 5 y 6 no son claras ya que se refieren a un receptor CAR el cual pretende definirse mediante sus secuencias de regiones variables de cadena ligera y pesada y/o a través de sus seis CDR's, sin embargo se define mediante las secuencias de las regiones scFv;
- Las Reivindicaciones 5 a 7 se consideran redundantes, toda vez que se refieren a la región scFv del receptor CAR mediante las mismas secuencias de aminoácidos sin la inclusión de características técnicas adicionales diferentes en cada reivindicación;
- Las Reivindicaciones 10 y 11 no son concisas ya que se encabezan como una célula, que debería definirse como una línea celular, toda vez que dicha caracterización podría comprender células totipotentes susceptibles de generar un organismo completo, es decir podría comprender materia no patentable;
- La Reivindicación 14 comprende la expresión: “*aproximadamente*” la cual es imprecisa, ya que no permite establecer el rango del parámetro para el diagnóstico;
- el Capítulo Descriptivo no divulga la invención de manera suficientemente completa para que persona normalmente versada en la materia técnica correspondiente pueda ejecutarla (o reproducirla), ya que se reivindica una

molécula CAR que se une selectivamente a TCRB1, la cual comprendería una infinidad de estructuras todas las cuales no han sido exploradas en la solicitud;

- el Capítulo Descriptivo no es claro ya que hace referencia a secuencias en tablas inexistentes o mal numeradas ya que por ejemplo se menciona la Tabla 1, pero esta no aparece en ningún aparte del Capítulo Descriptivo, mientras que la numeración de las tablas inicia con la Tabla 2 y no con la Tabla 1 como correspondería.

b- i) En primer lugar, me permito llamar respetuosamente la atención de la Examinadora sobre las modificaciones realizadas en el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto, como lo indiqué en el numeral 1a del presente memorial, del que se eliminaron las Reivindicaciones 2, 5, 6, 7, 11. Asimismo, en la nueva Reivindicación 9 (antigua Reivindicación 14) se eliminó la expresión “*aproximadamente*” considerada como imprecisa, por lo que considero superada cualquier objeción al respecto.

ii) Ahora bien, respecto a las objeciones de concisión y soporte de la Reivindicación 1, en primer lugar me permito señalar que el inventor tiene derecho de reclamar protección para la totalidad del concepto inventivo desarrollado, sin importar la amplitud de éste. Así, una reivindicación puede ser tan amplia como se requiera para así poder enmarcar la totalidad del concepto inventivo desarrollado, y no solamente las modalidades preferidas o específicamente ejemplificadas en la solicitud. En este sentido no debería existir obligación alguna de limitar el alcance de la materia reclamada únicamente a la materia estrictamente ejemplificada, pues esta medida reduciría de manera injusta el concepto inventivo al que el inventor tiene derecho. Asimismo, la posibilidad de obtener la invención en diversas modalidades es una práctica aceptada a nivel mundial en el ámbito de las patentes, ya que una patente de invención no se limita a una única modalidad, sino que cubre un concepto inventivo global que abarca diferentes modalidades (diversas materializaciones de la invención) ligadas por un efecto técnico común que finalmente delimita el alcance de la invención.

Además, vale la pena señalar que el inventor no está obligado a limitar la materia reclamada a lo que se describe e ilustra solo en los ejemplos, ya que éstos son meramente ilustrativos y no limitativos. De hecho, el inventor tiene derecho a reclamar protección para el concepto inventivo completo desarrollado, que en el presente caso incluye un receptor antigénico quimérico (CAR), con las características estructurales de la Reivindicación 1. Cabe resaltar que una persona medianamente versada en la materia conoce la estructura general de los CAR, por lo que también conoce una gran variedad de secuencias para uso como espaciadores, dominios transmembranales y endodominios. Además, el Capítulo Descriptivo de la presente invención describe 10 ejemplos en donde se evidencia el uso de

diferentes espaciadores, dominios transmembranales y endodominios, los cuales todos podrían usarse y resultan en un CAR funcional.

Específicamente, la Reivindicación 1 fue modificada para adicionar las características estructurales de los diferentes componentes de un receptor antigénico quimérico (CAR) que corresponden a (i) un dominio de unión al antígeno, (ii) un espaciador, (iii) un dominio transmembranal; y (iv) un endodominio, caracterizado porque el dominio de unión a antígenos se une selectivamente a la región constante del TCR beta 1 (TRBC1) y en donde el dominio de unión a antígenos tiene una cadena pesada variable (VH) y una cadena ligera variable (VL), las cuales comprenden las regiones determinantes de complementariedad (CDRs); CDR1 de VH: SEQ ID NO.: 7; CDR2 de VH: SEQ ID NO.: 8; CDR3 de VH: SEQ ID NO.: 9; CDR1 de VL: SEQ ID NO.: 10; CDR2 de VL: SEQ ID NO.: 11; y CDR3 de VL: SEQ ID NO.: 12.

Particularmente, el Capítulo Descriptivo proporciona información sobre los posibles espaciadores (página 33, línea 31 a página 34, línea 12), dominios transmembranales (página 33, línea 8 a 11) y endodominios (página 33, líneas 13 a 25) que pueden ser empleados para la producción de un CAR como el reclamado en la presente invención. Es decir, una persona medianamente versada en la materia se encuentra en completa capacidad de comprender con claridad que se pueden emplear diferentes espaciadores, dominios transmembranales y endodominios en conjunto con el dominio de unión del CAR de la presente invención, no solo a partir de sus conocimientos generales de la técnica, sino que además con base en la información que provee el Capítulo Descriptivo, y así reproducir la materia aquí reclamada.

iii) En cuanto a la nueva Reivindicación 6 (antigua Reivindicación 10), ésta ahora está limitada a células T o células NK, cuyo soporte se encuentra en la página 37, línea 14 del Capítulo Descriptivo Modificado. No obstante, para la persona medianamente versada en la materia es claro que dicha célula, independientemente de su identidad, difiere de una célula existente en la naturaleza, pues ésta comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la nueva Reivindicación 4 (debido a su relación de dependencia) que es una secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica un CAR según la invención, o un vector de la misma. Adicionalmente, vale la pena resaltar que el Capítulo Descriptivo divulga que el vector puede usarse para introducir la(s) secuencia(s) de ácido nucleico en una célula hospedadora de modo que exprese el CAR reivindicado de forma recombinante. Por todo lo anterior, considero que la objeción elevada respecto a la falta de concisión de esta reivindicación queda superada.

iv) Por otro lado, respecto a la objeción elevada por la Examinadora sobre la claridad del Capítulo Descriptivo, respetuosamente difiero de la opinión de la

Examinadora puesto que la numeración de las tablas en el Capítulo Descriptivo comienza con la Tabla 1 ubicada en la página 19 en tanto que el título de dicha tabla, por errores de edición, quedó al final de la página 18 justo sobre la línea 24. En cuanto a la Tabla 2, ésta se encuentra correctamente ubicada en la página 23, línea 4. No obstante, y con el fin de facilitar el entendimiento del Capítulo Descriptivo, me permito llamar la atención de la Examinadora sobre las modificaciones realizadas en el Capítulo Descriptivo Modificado adjunto, como lo indiqué en el numeral 1b del presente memorial, en el cual se editaron las Tablas 1 y 2 con el ánimo de facilitar su correcta interpretación y lectura, de tal manera que el único cambio resultante fue la numeración de las páginas del documento. En ese sentido, considero superadas las objeciones al respecto.

v) Así, a la luz de las modificaciones y argumentos planteados anteriormente, considero que el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto cumple con los requisitos de claridad y concisión establecidos en la Decisión 486, permitiéndole a la persona medianamente versada en la materia comprender inequívocamente el alcance de la materia reclamada para reproducirla sin recurrir a experimentación adicional excesiva.

3. a- La Examinadora establece que la solicitud carece de unidad de invención porque se refiere a 2 grupos inventivos, identificados de la siguiente manera:

- **Grupo I: Reivindicaciones 1 a 4 y 8 a 16.** Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende: i) un dominio de unión a antígenos que se une selectivamente a la región constante del TCR beta 1 (TRBC1) que comprende las regiones variables de cadena pesada (SEQ ID NO: 1) y ligera (SEQ ID NO: 2) o las CDR1 de VH: SEQ ID NO.: 7; CDR2 de VH: SEQ ID NO.: 8; CDR3 de VH: SEQ ID NO.: 9; CDR1 de VL: SEQ ID NO.: 10; CDR2 de VL: SEQ ID NO.: 11; y CDR3 de VL: SEQ ID NO.: 12., ii) un espaciador, un dominio transmembranal y iv) un endodominio, los vectores, líneas celulares y métodos asociados.
- **Grupo II: Reivindicaciones 1 y 5 a 16.** Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende: i) un dominio de unión a antígenos que se une selectivamente a la región constante del TCR beta 1 (TRBC1) que comprende las scFv con las SEQ ID NO: 13 a 22, ii) un espaciador, un dominio transmembranal y iv) un endodominio, los vectores, líneas celulares y métodos asociados.

Además, este último grupo inventivo no se encuentra soportado en el Capítulo Descriptivo, ya que únicamente existen pruebas técnicas para un CAR anti-TRBC1 que comprende un dominio de unión derivado de un anticuerpo denominado JOVI-1 que comprende las regiones variable de cadena pesada SEQ ID NO: 1 y de cadena ligera SEQ ID NO: 2 (Pág.

51-55, Ej.1-10), y por lo tanto no se evidencia soporte para la actividad de dichas estructuras.

b- i) En respuesta a esta objeción, me permito llamar respetuosamente la atención de la Examinadora sobre las modificaciones realizadas en el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto en el que se eliminaron las Reivindicaciones 2, 5, 6, 7 y 11 y en las modificaciones hechas a la Reivindicación 1, la cual fue limitada al concepto inventivo del Grupo I tal y como amablemente sugiere la Examinadora.

ii) De otra parte, me permito presentar una Solicitud Divisional B, cuyo alcance se encuentra dirigido a un CAR que comprende (i) un dominio de unión al antígeno, (ii) un espaciador, (iii) un dominio transmembranal; y (iv) un endodominio, en donde el dominio de unión a antígeno comprende las secuencias de CDR de cadenas pesada y ligera con SEQ ID NO: 13 a 22 y modalidades particulares del mismo.

Así, esta nueva solicitud divisional se presenta a propósito de la objeción de unidad de invención elevada por la Examinadora, y hace referencia a materia que fue eliminada de la presente Solicitud Parental y que no se encuentra reclamada en la Solicitud Divisional A, cumpliendo de esta manera con los requisitos establecidos en el Artículo 25 de la Decisión 486 y la Resolución 3917/2016 de la SIC. En vista de lo anterior, considero superada la objeción de unidad de invención elevada por la Examinadora.

4. a- La Examinadora señala que los documentos WO2013/074916 (D1) y “*Generation of monoclonal antibodies against a human T cell receptor beta chain expressed in transgenic mice*”¹ (D2) afectan el nivel inventivo de la Reivindicación 1.

La Examinadora establece que D1 es el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la Reivindicación 1, puesto que divulga un receptor quimérico de antígeno específico que funciona en la eliminación de la expresión de células que comprenden el receptor de células T (TCR) α/β , en donde las células que expresan los CAR son modificados mediante nucleasas con dominios de dedos de zinc (ZNFs) para generar células T universales y en donde las ZNF tiene sitios de reconocimiento en el *loci* genómico de las regiones constantes TCR- α y TCR- β , específicamente para las regiones constantes TRBC1 y TRBC2. La diferencia entre D1 y la invención consiste en que el receptor CAR de la presente invención comprende un dominio de unión a la región constante de TRBC1 o TRBC2.

¹ Viney JL, et al., “*Generation of monoclonal antibodies against a human T cell receptor beta chain expressed in transgenic mice*”, Hybridoma. 1992, 11(6), 701 a 713.

La Examinadora señala que no se evidencia efecto técnico. Por lo tanto, la Examinadora define que el problema técnico que pretende resolver la presente invención es: “¿cómo modificar la molécula CAR conocida en D1 para obtener un receptor CAR alternativo?”.

Sin embargo, D2 divulga dos anticuerpos JOVI-1 y JOVI-3 que reconocen determinantes antigénicos sobre las cadenas alfa y beta de los TcR y tiene la habilidad de inmunoprecipitar dichas cadenas a partir de células T, constituyéndose como herramientas útiles en estudios de enfermedades mediadas por células T, en donde el anticuerpo JOVI-1 es clínicamente relevante por su efecto en la eliminación de un gran repertorio de células T. Por lo tanto, para la Examinadora, una persona medianamente versada en la materia siguiendo las enseñanzas de D2 hubiese incluido un dominio de unión proveniente del anticuerpo anti TCRBC1 o TCRBC2 en un receptor CAR de D1, llegando de manera obvia a la Reivindicación 1.

ii) En cuanto a mis argumentos en respuesta al primer examen de fondo, la Examinadora señala que tal y como se presenta la Reivindicación independiente no es posible establecer las propiedades funcionales ya éstas únicamente se pueden determinar con precisión a partir de una estructura específica. Además, dado que la Reivindicación 1 se refiere a una generalidad de los receptores CAR que comprenden un dominio de unión a TCRB1 que comprende en una de sus modalidades un dominio de unión derivado de un anticuerpo JOVI-1, éste ya era conocido en D2. Por lo tanto, no es posible establecer si el CAR reivindicado comprende un dominio de unión diferente al señalado en D2 hasta tanto, dicho anticuerpo cumpla con los requerimientos que permitan definir su estructura específica.

b- i) En respuesta a la objeción de la Examinadora, en primer lugar me permito señalar que la presente invención ahora reclama un receptor antigénico quimérico (CAR) que comprende:

- i) un dominio de unión a antígenos,
- ii) un espaciador,
- iii) un dominio transmembranal, y
- iv) un endodominio,

caracterizado porque el dominio de unión a antígenos se une selectivamente a la región constante del TCR beta 1 (TRBC1) y en donde el dominio de unión a antígenos tiene una cadena pesada variable (VH) y una cadena ligera variable (VL), las cuales comprenden las siguientes regiones determinantes de complementariedad (CDRs):

CDR1 de VH: SEQ ID NO.: 7;

CDR2 de VH: SEQ ID NO.: 8;

CDR3 de VH: SEQ ID NO.: 9;

CDR1 de VL: SEQ ID NO.: 10;

CDR2 de VL: SEQ ID NO.: 11; y

CDR3 de VL: SEQ ID NO.: 12.

ii) Teniendo claro el alcance de la materia reclamada, y en vista del arte previo citado, me permito realizar nuevamente el análisis de nivel inventivo de acuerdo con la Guía para Examen de Solicitudes de Patente y Modelos de Utilidad de la SIC (en adelante, Guía de la SIC)². La Guía de la SIC señala que *“Durante el examen de nivel inventivo debe hacerse un juicio de valor y un análisis objetivo de las divulgaciones previas del estado de la técnica, no influenciados por el conocimiento que ya se tiene de la Invención que se está evaluando. Por tanto, con el fin de minimizar la subjetividad y evitar que se realice un análisis en retrospectiva (“hindsight” ó “a posteriori”), el examen debe relacionar la invención con la solución de un problema técnico, mediante el Método “problema-solución” (énfasis fuera de texto).*

A. Identificar el estado de la técnica cercano a la invención reivindicada.

Ahora bien, a continuación me permito presentar mis argumentos a favor del nivel inventivo de la invención. Para el presente caso, tal como lo hizo el Examinador en su análisis, tomaré a D1 como el documento más cercano a la materia reclamada de la Reivindicación 1 de la presente solicitud.

D1 menciona la región constante de TCR β pero solo en el contexto del diseño de dedos de zinc para eliminar la expresión de TCR (párrafos [00163] y [00188]). D1 divulga que el único receptor de antígeno quimérico específicamente descrito para uso en las células TCR es específico para el antígeno CD19 de células B (párrafos [00201] y [00207]).

D1 como el documento más cercano divulga métodos y composiciones para inmunoterapia que emplean una célula T modificada que comprende un receptor de células T alterado y/o HLA y que comprende un receptor de antígeno quimérico. En ciertas modalidades, las composiciones se emplean alogénicamente como reactivos universales para el tratamiento comercial de condiciones médicas tales como el cáncer, autoinmunidad e infección. D1 divulga células T negativas para receptor de células T y/o HLA negativas se generan usando nucleasas de dedos de zinc.

B. Determinar la diferencia entre la invención y el estado de la técnica más cercano.

² Superintendencia de Industria y Comercio, Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad de la SIC, 2014, sección 2.13.5, páginas 131-134

Contrario a lo que señala la Examinadora, D1 no describe un CAR específico que funciona al eliminar la expresión de células que comprenden TCR- α y TCR- β , sino que D1 describe el uso de dedos de zinc para eliminar la expresión de TCR- α y TCR- β en células T.

C. Definir el efecto técnico causado y atribuible al elemento diferencial.

Los inventores de la presente invención hicieron los siguientes hallazgos claves:

1. Los linfomas y leucemias de células T son clonales para su expresión de TRBC1 o TRBC2 (ver la presente solicitud, el Ejemplo 11 y las Figuras 17 a 20).
2. Es posible que una célula CAR-T mate específicamente las células TRBC1 + o TRBC2 + CAR T (Ejemplo 6 y Figura 9)
3. Un compartimento de células T empobrecido de células TRBC1 + o TRBC2 conserva su función, por ejemplo, al proporcionar inmunidad antiviral (Ejemplo 7 y Figura 10).

Anticuerpos contra antígenos de células T, como TCR y CD3, se conocen desde hace muchos años. Sin embargo, en vista de las consideraciones de seguridad mencionadas anteriormente, hasta ahora, nadie ha considerado realizar un CAR contra un antígeno de células T o utilizar un enfoque basado en células T CAR para tratar el linfoma de células T o la leucemia. Solo a la vista de los tres hallazgos claves mencionados anteriormente, los presentes inventores concluyeron que es posible tratar tumores malignos de células T utilizando un enfoque basado en células TRBC1 + o TRBC2 + CAR-T.

Adicionalmente, vale la pena resaltar que el receptor de células T (TCR) se expresa en la superficie de los linfocitos T y es responsable de reconocer los antígenos unidos a las moléculas del complejo de histocompatibilidad principal (MHC). El TCR es un heterodímero anclado a una membrana unida a disulfuro de una cadena alfa (α) y beta (β). Cada cadena α y β se compone de dos dominios extracelulares: una región variable (V) y una región constante (C). La región constante está próxima a la membrana celular, seguida de una región transmembrana y una cola citoplásmica corta, mientras que la región variable se une al complejo péptido/MHC como se evidencia en la Figura 1 de la presente invención. La región constante del TCR consiste en secuencias de conexión cortas en las que un residuo de cisteína forma enlaces disulfuro, que forma un enlace entre las dos cadenas.

Como se describe en la página 14 del Capítulo Descriptivo, el locus (Chr7: q34) que suministra la región TCR β -constante (TRBC) se ha duplicado en la historia evolutiva para producir dos genes casi idénticos y funcionalmente equivalentes: TRBC1 y TRBC2 (Figura 2). Cada TCR comprende TRBC1 o TRBC2 y cada una de las células T $\alpha\beta$ expresa

TRBC1 o TRBC2, de una manera mutuamente exclusiva. En un trastorno clonal de células T, como un linfoma de células T o leucemia, las células T malignas derivadas del mismo clon expresan TRBC1 o TRBC2. Las células CAR-T que expresan un CAR de TRBC1 o específico de TRBC2 de la presente invención pueden usarse para causar la depleción selectiva de las células T malignas, junto con las células T normales que expresan la misma TRBC que las células T malignas, pero no causa un agotamiento significativo de las células T normales que expresan la otra TRBC de las células T malignas. Por ejemplo, se puede usar una célula CAR-T específica de TRBC1 para destruir las células T malignas en un paciente con un linfoma de células T TRBC1 positivo o leucemia, junto con células T sanas que expresan TRBC1. La subpoblación TRBC2-positiva del paciente se salva.

Debido a que el agente selectivo de TRBC no causa un agotamiento significativo de las células T normales que expresan la otra TRBC de las células T malignas, no causa la depleción del compartimento de células T completo. La retención de una proporción del compartimento de células T del sujeto (es decir, células T que no expresan la misma TRBC que la célula T maligna) es suficiente para mantener la función normal de las células T, por ejemplo, para prevenir la infección. Por lo tanto, cualquier dominio de unión que se una selectivamente a TRBC1 y no a TRBC2 funcionará en el CAR reclamado.

Como se explicó en la sección de antecedentes de la presente solicitud, es posible usar un antígeno de células pan-B para tratar tumores malignos de células B. El agotamiento a corto plazo del compartimento de células B da como resultado una inmunosupresión relativamente menor que la tolerada fácilmente por la mayoría de los pacientes. La depleción de células B a largo plazo se puede derogar en gran medida mediante la administración de inmunoglobulina combinada. Esta es la razón por la que los antígenos de células pan-B, tales como CD19, son objetivos atractivos para la terapia con células T CAR. Como se mencionó anteriormente, se ha logrado un éxito considerable en clínica usando células CD19 CAR T contra las neoplasias de células B.

La situación es completamente diferente cuando se trata de tumores malignos de células T. Aquí, el agotamiento concomitante del compartimento de células T conduce a una inmunosupresión grave y toxicidad severa. Además, actualmente no es posible mitigar la pérdida del compartimento de células T. La opinión predominante es que las neoplasias de células T son imposibles de tratar usando enfoques basados en células CAR-T. Se supone que la terapia de células CAR-T contra un antígeno de células T conduciría a una toxicidad e inmunosupresión inmanejable y posiblemente mortal. La muerte mediada por células CAR-T es rápida e “incontrolada”, a diferencia de una terapia anticancerosa basada en anticuerpos monoclonales o farmacéuticos, las células CAR-T no son eliminadas por el cuerpo, por lo que no es posible reducir o detener la administración para controlar el efecto.

Los presentes inventores han logrado un gran avance al encontrar que se pueden agotar las células T malignas en un sujeto, mientras se deja una proporción de células T sanas para mantener la inmunidad mediada por células T.

D. Deducir el problema técnico a solucionar.

La Guía de la SIC señala que el problema técnico debe ser planteado de la siguiente manera: “¿cómo modificar o adaptar el estado de la técnica cercano para obtener el efecto técnico que la invención proporciona?”³

En vista de lo anterior, difiero respetuosamente del problema planteado por el Examinador, pues pese a lo establecido por la Guía de la SIC, el Examinador no tiene en cuenta los efectos técnicos que la invención proporciona al plantear el siguiente problema técnico: “¿cómo modificar la molécula CAR conocida en D1 para obtener un receptor CAR alternativo?”

De esta manera, considero válido reformular el problema técnico de la siguiente manera: “¿cómo modificar el CAR de D1 para obtener un CAR selectivo a TRBC1 y no a TRBC2?”.

E. Evaluar si la invención reivindicada, partiendo del estado de la técnica cercano y del problema técnico objetivo, habría sido obvia para la persona medianamente versada en la materia.

i) En este punto me permito nuevamente resaltar la Guía de la SIC que establece: “esta etapa consiste en responder a la pregunta de si en el estado de la técnica en su conjunto hay un segundo documento que contiene una enseñanza que indicaría (no sólo que **podría indicar**, sino que **indicaría**) a la persona medianamente versada en la materia, enfrentada al problema técnico, cómo modificar o adaptar el estado de la técnica más cercano para resolver el problema, de la forma reivindicada” (énfasis fuera del texto). Así, el análisis de nivel inventivo de solicitudes de patente, no se trata de encontrar en el arte previo una mera invitación a experimentar con uno o más cambios aleatorios, sino de identificar en los documentos citados una enseñanza y guía específica para hacer las modificaciones necesarias y no otras que lo lleven con certeza a la materia reclamada.

Tal y como lo señalé anteriormente, D1 se diferencia de la presente invención en que D1 no proporciona las enseñanzas y sugerencias necesarias que de forma clara e inequívoca motiven a la persona medianamente versada en la materia a llegar a la presente invención,

³ Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad. (2014), Sección 2.13.5, páginas 131-134

que comprende las características estructurales reclamadas que a su vez se encuentran definidas por seis CDRs, por lo que la estructura específica del CAR caracterizado porque el dominio de unión a antígenos se une selectivamente a la región constante del TCR beta 1 (TRBC1) no se encuentra divulgado por D1. Particularmente, y como se menciona anteriormente, D1 describe el uso de dedos de zinc para eliminar la expresión de TCR- α y TCR- β en células T. Asimismo, D1 no divulga ni enseña la producción de CAR específicos a TRBC1 y no a TRBC2.

Por lo tanto, una persona medianamente versada en la materia basada únicamente en las divulgaciones y enseñanzas de D1 y frente al problema de proporcionar un CAR específico que funcione al eliminar la expresión de células que comprenden TCR- α y TCR- β , y que sea selectivo a TRBC1 y no a TRBC2, no estaría motivada a usar las enseñanzas dadas en D1 para modificar las secuencias de aminoácidos de los CDRs de la presente invención.

Con respecto a D2, este documento describe la generación de dos anticuerpos monoclonales mediante la inmunización de un ratón con células T de una línea de ratón transgénico que expresa un TCR V β 3C β 1 humano. El propósito del estudio fue generar anticuerpos monoclonales para diferentes regiones TCR V que podrían usarse para investigar el uso de TCR en sitios de enfermedades tales como autoinmunidad, alergia y cáncer (Resumen e Introducción, párrafo 1).

D2 describe un anticuerpo contra una cadena beta de TCR humano que reacciona con una proporción de células T. Sin embargo, no está del todo claro en qué proporción. Las enseñanzas de D2 no superarían los problemas de seguridad del uso de células T CAR para las neoplasias de células T. Por lo tanto, la persona medianamente versada en la materia no contemplaría el uso de los anticuerpos JOVI-3 o JOVI-1 descritos en el documento en una célula CAR T. De acuerdo con los autores de D2:

"Por lo tanto, no está claro qué epítipo en el TCR es reconocido por JOVI-1. Es posible que reconozca un determinante supertípico en dominios V β o un epítipo V β que está influenciado por el V α particular que está asociado con el dominio V β . Alternativamente, JOVI-1 puede reconocer un determinante de C β que está enmascarado en algunas células T por interacciones del TCR con otras proteínas." (Página 711, párrafo 3, líneas 1-7).

Es decir, a partir de la información proporcionada en D2, no sería claro para la persona medianamente versada en la materia si JOVI-1 se une a la región TCR V o C.

Como se explicó anteriormente, los autores de D2 no estaban seguros de si JOVI-1 se unía a la región V o C de TCR. Ciertamente, no llegaron a la conclusión de que JOVI-1 fuera específico para TRBC1: su explicación para la observación de que JOVI-1 reaccionó con

un subconjunto (50-75%) de células T es que el epítipo puede estar enmascarado por la interacción del TCR con otras proteínas. De hecho, D2 enseña que JOVI-1 NO es específico para TRBC1, y se une tanto a TRBC1 como a TRBC2.

A este respecto, los datos presentados en la Tabla 1 de D2 (página 706) muestran que la tinción de JOVI-1 se observó con una línea celular que expresaba un Vβ7 Cβ2 TCR y un clon de células T que expresaba un Vβ6 Cβ2 TCR, aunque a niveles inferiores a la tinción observado con dos líneas de células T positivas para Cβ1 y cuatro clones de células T positivas para Cβ1.

Dado que la presente invención se refiere a un CAR selectivo TRBC1 + o TRBC2 +. Los datos presentados en D2 enseñarían a alejarse del uso de JOVI-1 en dicho CAR, ya que enseñaría a la persona medianamente versada en la materia que JOVI-1 tiene reactividad cruzada con TRBC2.

ii) Así las cosas, y a la luz de las evidentes diferencias encontradas entre la materia reclamada en la solicitud frente al arte previo, vale la pena señalar que de acuerdo con el MAP, para que pueda negarse la existencia de nivel inventivo, es necesario, no solamente que la combinación de las enseñanzas pueda hacerse, sino también que exista una sugerencia o razón tal, que lleve al técnico con conocimientos medios a combinar las enseñanzas de los documentos⁴. Además, el MAP también establece que las invenciones en el campo de la química tienen nivel inventivo cuando los compuestos (en este caso, composiciones) tienen **una estructura inesperada** (no derivable por la persona medianamente versada en la materia) **o** cuando presentan un **efecto técnico inesperado o mejorado impredecible del arte previo**⁵. De manera similar, la Guía de la SIC establece que, para que una invención no resulte inventiva “*el conjunto de enseñanzas del estado de la técnica lo llevarían (a la persona medianamente versada en la materia) de forma inmediata a la solución propuesta por la solicitud. **Si se requiere de pasos adicionales o de corroboración o de superar obstáculos revelados por las propias enseñanzas entonces el estado de la técnica no revela la solución al problema***”⁶ (énfasis fuera del texto). Lo cual no sucede en el presente caso, toda vez que el anticuerpo reclamado y su correspondiente efecto técnico no pudieron haber sido predichos con éxito a partir del arte previo que menciona la Examinadora.

En vista de lo anterior, el objeto de las reivindicaciones es inventivo sobre D1 en combinación con D2 puesto en ninguno de dichos documentos se describe un agente que tenga la habilidad para discriminar entre TRBC1 y TRBC2.

⁴Comunidad Andina de Naciones, Manual Andino de Patentes, 2004, Sección 10.2.1 - Ejemplo 1

⁵Ibídem, Sección 10.8.1

⁶Superintendencia de Industria y Comercio, *op. cit.*, sección 2.13.2

iii) De otra parte, respetuosamente me permito señalar que los resultados del Primer Examen de Fondo no parecen haberse regido por lo estipulado en la Guía de la SIC en cuanto la evaluación de nivel inventivo, ya que ésta debe basarse únicamente en si existen **sugerencias explícitas y suficientes** en el arte previo que indicarían de manera clara cómo desarrollar de manera obvia los líquidos aquí reclamados, que, como se demostró anteriormente, no existen. En consecuencia, no debe ser aceptable a quien examina o a quién concede o deniega una patente desvirtuar el nivel inventivo de la misma por simplemente desglosar sus elementos separadamente y luego buscar referencias en el estado del arte que los incluyan, como si de armar un rompecabezas con piezas aisladas, o una colcha de retazos, se tratara. En este caso particular, y contrario al análisis resumido en el Primer Examen de Fondo, como es evidente del análisis del arte previo realizado anteriormente, la única forma en que una persona medianamente versada en la materia podría llegar a los anticuerpos de la presente invención siguiendo los argumentos planteados en dicho examen, sería al realizar un análisis en retrospectiva una vez conoce la invención aquí reclamada.

El estudio de solicitudes de patente que conduzca a ese tipo de conclusiones anticipadas corresponde abiertamente a un análisis conocido en el ámbito de patentes como “**análisis hindsight**” o en retrospectiva. Para entender el análisis equivocado que se presenta en el Primer Examen de Fondo, podemos citar nuevamente el MAP, que indica claramente que “...la búsqueda de anterioridades se efectúa a posteriori, tomando como punto de partida la misma invención, La SIC debe realizar el esfuerzo intelectual de colocarse en la situación que ha tenido que afrontar el técnico con conocimientos medios en la materia en un momento en que la invención no era conocida, es decir antes de la invención”⁷ (mi subrayado). Por ende, no es apropiado anticiparse a los resultados presentados por la invención, ya que así, siempre resultará “obvio” todo objeto de una solicitud de patente, pues inevitablemente está parecerá derivada de la teoría en que se basa su desarrollo, sin dar mayor importancia al trabajo, intelecto y creatividad involucrados en la invención para llegar a la solución del problema planteado en la solicitud.

Aceptar el estándar de nivel inventivo del presente examen de fondo, donde supuestamente el desarrollo de las composiciones aquí reclamadas es obvio, equivaldría a desdibujar el objetivo principal del sistema de patentes, que es precisamente fomentar la investigación y desarrollo de mejoras incrementales. **Nada se inventa de la nada.** Necesariamente, la tecnología avanza en pasos discretos constituida por mejoras concretas a lo que se conoce. El sistema de patentes recompensa al inventor que proporciona una solución que no resultaría previsible a partir del estado de la técnica. Lo anterior además quiere decir que el resultado inventivo no podría ser desarrollado sin algún grado de experimentación o que presente resultados inesperados.

⁷Comunidad Andina de Naciones, *op. cit.*, Sección 10.2.1

Es decir, el análisis resumido en el Primer Examen de Fondo simplemente combina las características previamente mencionadas de D1 y D2 con base en los conocimientos ya otorgados por la presente invención, sin considerar las enseñanzas de dicho arte previo y las diferencias con la presente invención. Así entonces, las conclusiones del examen aquí objetado simplemente apuntan a encontrar las características esenciales del anticuerpo reclamado en la presente invención en el arte previo de forma aislada.

En conclusión, como se resalta en Artículo 18 de la Decisión 486, las invenciones deberían considerarse como inventivas cuando la materia reclamada no puede ser derivada del arte previo. Adicionalmente, la presente invención es inventiva a la luz del arte previo citado, pues siguiendo las enseñanzas de D1 y D2, la persona medianamente versada en la materia no obtendría la materia reclamada, ni podría esperar que ésta presentase las propiedades que en efecto reviste.

4. Por todo lo anterior, considero que las objeciones presentadas por el Examinador en su primer examen de fondo han sido resueltas y por consiguiente solicito respetuosamente que el Despacho tenga por cumplidos los requisitos de patentabilidad y proceda con la concesión de la patente.

5. Finalmente, si el Despacho lo considera necesario, solicito amablemente proceda a realizar un tercer examen de fondo, para lo cual adjunto el comprobante de pago de la tasa de examen correspondiente. De otra forma, considero que la presente solicitud cumple con los requisitos de patentabilidad establecidos por la Decisión 486 y por consiguiente solicito respetuosamente que el Despacho proceda con la concesión de la patente.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE

C.C. No. 79.782.747 de Bogotá

T.P. 74.295

Anexos:

- Capítulo Reivindicatorio Modificado;
- Capítulo Descriptivo Modificado;
- Capítulo Reivindicatorio de Divisional B
- Capítulo Descriptivo de Divisional B;
- Recibo de pago por examen de fondo adicional.