DOMINIO DE UNIÓN A ANTÍGENO

CAMPO DE LA INVENCIÓN

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

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 angioinmunoblástico de células T (AITL) y linfoma anaplásico de células grandes (ALCL). De todas las Leucemias Linfoblásticas Agudas (ALL), algo como el 20% son de un fenotipo de células T.

Estos padecimientos típicamente se comportan agresivamente, en comparación, por 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 Pronosticó (IPI) y prevalencia de enfermedad extranodal. La quimioterapia sola usualmente no es efectiva y menos del 30% de los pacientes se 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 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).

Existe el mismo problema cuando se enfoca un antígeno de células pan-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 αβ/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 (CD3ζ, CD3γ, CD3ε y CD3δ) envuelven al receptor de células T (TCR). El TCR infunde al complejo de especificidad de un antígeno particular, y se compone de dos cadenas: TCRα y TCRβ. 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 ya sea por TRBC1 o por TRBC2.

Figura 3: Alineamiento de las TRBC1 y TRBC2 humanas a nivel de aminoácidos. La cadena constante de TCRβ 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: Diagramas esquemáticos que ilustran diferentes tipos de anticuerpos referidos a la generación de uniones anti-TRBC1 humanizados.

Figura 5: Selección del injerto de cadena pesada y ligera. Los dominios VH y VL humanizados fueron creados para comprender las CDR de JOVI-1 junto con diversas regiones de marco humanas. Los anticuerpos quiméricos se generaron para comprender dominios VL múrido con VH humanizado, o VL humanizado con dominios VH múrido y se compararon con un anticuerpo quimérico control que tiene VH y VL múrido (HC quimera Jovi-1/LC quimera Jovi-1). Los anticuerpos humanizados fueron creados también con combinaciones VH y VL humanizados. Todos los anticuerpos fueron comprobados para unión a TRBC1 mediante ELISA.

Figura 6: Unión TRBC1/TRBC2 de constructos de mutación revertida. Unas series de constructos VH de mutación revertida fueron creadas con base en el marco H-AF062256 como se muestra en la Tabla 1. Estos dominios VH fueron utilizados para crear anticuerpos humanizados en combinación con un dominio VL que tiene el marco humano 3aaz. Los anticuerpos fueron comprobados para unión a TRBC1 y TRBC2 mediante ELISA.

Figura 7: Estabilidad de constructos de anticuerpo anti-TRBC1 (Tm ºC). La estabilidad de anticuerpos que comprenden los constructos de mutación revertida se muestra en la Tabla 1 con una cadena ligera humanizada 3aaz en comparación con el anticuerpo JOVI-1 múrido.

Figura 8: Estabilidad de constructos de anticuerpo anti-TRBC1 (Tm ºC).

Figura 9: Diagrama esquemático que ilustra un receptor antigénico quimérico (CAR) anti-TRBC1 humanizado.

Figura 10: Eliminación específica mediada por CAR de TRBC1+objetivos. Células T sin transfectar, o células T que expresan un CAR anti-TRBC1 múrido (control positivo); un CAR anti-TRBC1 humanizado; o un CAR anti-EGFRvIII (control negativo) fueron cultivadas en conjunto con células objetivo Raji que expresan TRBC2 o que expresan TRBC1 y la eliminación se analizó mediante el uso de citometría de flujo.

Figura 11: Proliferación de células T que expresan CAR posterior al cultivo conjunto con células objetivo. Células T sin transfectar, células T que expresan un CAR anti-TRBC1 múrido; o células T que expresan un CAR anti-TRBC1 humanizado; fueron cultivadas en conjunto con células objetivo Raji que expresan TRBC2 o que expresan TRBC1 durante 72 horas y se midió la proliferación de células T.

Figura 12: Liberación de citoquinas posterior al cultivo conjunto de células T que expresan CAR y células objetivo. Células T sin transfectar, o células T que expresan un CAR anti-TRBC1 múrido (control positivo); un CAR anti-TRBC1 humanizado; o un CAR anti-EGFRvIII (control negativo) fueron cultivadas en conjunto con células objetivo Raji que expresan TRBC2 o que expresan TRBC1. Se midió la liberación de IFNγ e IL-2 después de 24 horas.

Figura 13: Efecto de CAR anti-TRBC1 humanizado en el crecimiento tumoral en un modelo de ratón NSG.

Figura 14: Expresión de marcadores de agotamiento posterior al cultivo en conjunto con células objetivo. Se transdujeron PBMC activadas con el CAR JOVI1 múrido (mJOVI) o CAR Jovi-1 humanizado (bisagra H1L), extraído de células que expresan CD56 y cultivadas en conjunto con células objetivo Raji que expresan TCR-TRBC1. Después de 96 horas, las células fueron teñidas con anticuerpos anti-PD1, anti-LAG3 y anti-Tim3 y después se analizaron mediante citometría de flujo.

SUMARIO DE ASPECTOS DE LA INVENCIÓN

Los inventores han desarrollado una serie de dominios de unión a antígeno humanizado los cuales unen TRBC1 humano. El dominio de unión a antígeno se puede utilizar en una diversidad de formatos terapéuticos, que incluyen un receptor antigénico quimérico (CAR), anticuerpos terapéuticos, conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) y acoplador biespecífico de células T (BiTE) para extraer células T que expresan TRBC1 malignas en un sujeto, sin afectar células T que expresan TRBC2 sanas.

De este modo en un primer aspecto, la invención proporciona dominio de unión a antígeno anti-TRBC1 el cual comprende:

a) un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona de SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 17 y SEQ ID No. 18; y

b) un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona de SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 22, SEQ ID No. 23, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 34.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un receptor antigénico quimérico (CAR) el cual comprende un dominio de unión a antígeno anti-TRBC1 de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un anticuerpo el cual comprende un dominio de unión a antígeno anti-TRBC1 de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un acoplador biespecífico a células T (BiTE) el cual comprende un dominio de unión a antígeno anti-TRBC1 de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

En un quinto aspecto, la invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco el cual comprende un dominio de unión a antígeno anti-TRBC1 de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

En un sexto aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.
En un séptimo aspecto, la invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el sexto aspecto de la invención.

En un octavo aspecto, la invención proporciona una célula que comprende un CAR de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

En un noveno aspecto, la invención proporciona un método para producir una célula de acuerdo con el octavo aspecto de la invención, el cual comprende la etapa de introducir un ácido nucleico de acuerdo con el sexto aspecto de la invención o un vector de acuerdo con el séptimo aspecto de la invención dentro de una célula.

En un décimo aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica la cual comprende una pluralidad de células de acuerdo con el octavo aspecto de la invención, un anticuerpo de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, un BiTE de acuerdo con el cuarto

aspecto de la invención o un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con el quinto aspecto de la invención.

En un decimoprimer aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con el décimo aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de un linfoma o leucemia de células T que expresan TRBC1 en un sujeto.

En un decimosegundo aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento de un linfoma o leucemia de células T que expresan TRBC1 en un sujeto, el cual comprende la etapa de administrar una composición farmacéutica de acuerdo con el décimo aspecto de la invención a un sujeto.

En un decimotercer aspecto, la invención proporciona el uso de una composición farmacéutica de acuerdo con el décimo aspecto de la invención en la producción de un medicamento para el tratamiento de un linfoma o leucemia de células T que expresan TRBC1 en un sujeto.

El linfoma o leucemia de células T que expresan TRBC1 se puede seleccionar de: linfoma de células 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 leucemia linfoblástica aguda de células T.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención proporciona agentes, tales como receptores antigénicos quiméricos (CAR), los cuales se unen selectivamente a TRBC1. 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. Mediante la administración de un agente selectivo a TCRB1 al sujeto, el agente da lugar a extracción selectiva de células T malignas que expresan TRBC1, junto con células T normales que expresan TRBC1, pero no da lugar a la extracción de células T normales que expresan TRBC2.

REGIÓN CONSTANTE DE TCR β (TRBC)

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 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 T que expresan este receptor se refieren como células T α:β (o αβ) (~95% de las células T totales). Una minoría de las células T expresan un receptor alterno, formado por cadenas variables gamma (γ) y delta (δ), y se refieren como células T γδ (~5% de las células T totales).

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 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 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 citoplasmáticos específicos que interactúan con moléculas de segundos mensajeros y adaptadoras posterior al reconocimiento del antígeno por parte de αβ o γδ. 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), las cuales difieren únicamente por 4 aminoácidos en la proteína madura producida por cada una (Figura 3). Cada TCR comprenderá, en una forma mutuamente exclusiva, TRBC1 o TRBC2 y, como tales, cada célula T αβ expresará TRBC1 o TRBC2, de manera mutuamente exclusiva.

A pesar de la similitud entre la secuencia de la TRBC1 y la TRBC2, es posible discriminar entre las mismas. Las secuencias de aminoácidos de TRBC1 y TRBC2 pueden discriminarse, aunque *in situ* en la superficie de una célula, por ejemplo, una célula T.

DOMINIO DE UNIÓN A ANTÍGENOS

La presente invención proporciona un dominio de unión a antígeno anti-TRBC1 humanizado el cual tiene una cadena pesada variable (VH) y una cadena ligera variable (VL), las cuales comprenden las siguientes regiones determinantes de complementariedad (CDR):
CDR de VH: GYTFTGY (SEQ ID No. 1);
CDR2 de VH de: NPYNDD (SEQ ID No. 2);
CDR3 de VH: GAGYNFDGAYRFFDF (SEQ ID No. 3);
CDR1 de VL: RSSQRLVHSNGNTYLH (SEQ ID No. 4);
CDR2 de VL: RVSNRFP (SEQ ID No. 5); y
CDR3 de VL: SQSTHVPYT (SEQ ID No. 6).

El dominio de unión a antígeno comprende regiones marco humanas, o regiones marco humanas con una o más mutaciones. Por ejemplo, la o las regiones marco pueden comprender una o más sustituciones comparadas con la secuencia región marco humana. Las sustituciones pueden ser “mutaciones revertidas” donde uno o más aminoácidos se sustituyen con el residuo equivalente de la secuencia de anticuerpo múrido. La secuencia de cadena pesada variable (VH) del anticuerpo se muestra a continuación como SEQ ID No. 7 y la secuencia de cadena ligera variable (VL) se muestra como SEQ ID No. 8. En ambas secuencias, las secuencias CDR aparecen en negritas y subrayadas.

SEQ ID No. 7 - VH Jovi-1 múrido
EVRLQQSGPDLIKPGASVKMSCKASGYTFTGYVMHWVKQRPGQGLEWIGFINPYNDDIQSNE
RFRGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGQGTTLTVSS

SEQ ID No. 8 - VL Jovi-1 múrido
DVVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFPGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIKR

Una secuencia VH humanizada comprende las CDR JOVI-1 múridas que se muestran como SEQ ID No. 1, 2 y 3 que pueden comprender 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2 o 1 mutación en comparación con la secuencia de región marco humana tipo silvestre.

Una secuencia VL humanizada comprende las CDR JOVI-1 múridas que se muestran como SEQ ID No. 4, 5 y 6 que pueden comprender 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2 o 1 mutación en comparación con la secuencia de región marco humana tipo silvestre.

La secuencia VH puede comprender VH de CDR JOVI-1 con el marco humano H-AF062256. Esta secuencia se muestra como SEQ ID No. 9. Las secuencias CDR están subrayadas.

SEQ ID No. 9 - marco H-AF062256 Jovi-1 humanizado
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYVMHWVRQAPGQGLEWMGFINPYNDDIQSNERFRGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGQGTMVTVSS

La secuencia VH puede comprender CDR JOVI-1 VH con el marco humano H-EF177999. Esta secuencia se muestra como SEQ ID No. 10. Las secuencias CDR están subrayadas.

SEQ ID No. 10 - marco H-EF177999 Jovi-1 humanizado
EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYVMHWVRQAPGQGLEWMGFINPYNDDIQSNERFRGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGQGTLVTVSS

La secuencia VH puede comprender VH de CDR JOVI-1 con el marco humano H-KF688165. Esta secuencia se muestra como SEQ ID No. 11. Las secuencias CDR están subrayadas.

SEQ ID No. 11 - marco H-KF688165 Jovi-1 H humanizado
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASEYSFTGYVMHWVRQAPGQGLEWMGFINPYNDDIQSNERFRGRVTMTRDTSISTAYMEVSSLTSDDAAIYYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGQGTLVTVSS

La secuencia VH puede comprender la secuencia que se muestra como SEQ ID No. 9, 10 u 11 con una o más mutaciones, tales como mutaciones revertidas. La secuencia VH puede comprender 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2 o 1 mutación en comparación con la secuencia de región marco humana tipo silvestre. Por ejemplo, la secuencia VH puede

comprender la secuencia que se muestra como SEQ ID No. 9 con uno de los conjuntos de mutaciones revertidas que se muestran en la Tabla 1 en los Ejemplos.

La secuencia VH puede comprender una de las secuencias mostradas como SEQ ID No. 12 a 18. Las secuencias CDR están subrayadas y las mutaciones revertidas se muestran en negritas.

SEQ ID No. 12 - mutación K73
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYVMHWVRQAPGQGLEWMGFINPYNDDIQSNERFRGRVTMTRD**K**SISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGQGTMVTVSS

SEQ ID No. 13 - mutación S71
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYVMHWVRQAPGQGLEWMGFINPYNDDIQSNERFRGRVTMT**S**DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGQGTMVTVSS

SEQ ID No. 14 - mutaciones S71, K73
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYVMHWVRQAPGQGLEWMGFINPYNDDIQSNERFRGRVTMT**S**D**K**SISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGQGTMVTVSS

SEQ ID No. 15 - mutación I48
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYVMHWVRQAPGQGLEW**I**GFINPYNDDIQSNERFRGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGQGTMVTVSS

SEQ ID No. 16 - mutación I48, K73
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYVMHWVRQAPGQGLEW**I**GFINPYNDDIQSNERFRGRVTMTRD**K**SISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGQGTMVTVSS

SEQ ID No. 17 - mutaciones M20, S71, K73
QVQLVQSGAEVKKPGASVK**M**SCKASGYTFTGYVMHWVRQAPGQGLEWMGFINPYNDDIQSNERFRGRVTMT**S**D**K**SISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGQGTMVTVSS

SEQ ID No. 18 - mutaciones M20, I48

QVQLVQSGAEVKKPGASVK**M**SCKASGYTFTGYVMHWVRQAPGQGLEW**I**GFINPYNDDIQSNE
RFRGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGQGTMVTVSS

La secuencia VL puede comprender CDR JOVI-1 VH con el marco humano 3aaz. Esta secuencia se muestra como SEQ ID No. 19. Las secuencias CDR están subrayadas.

SEQ ID No. 19
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVSNRFPGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGQGTKLEIK

La secuencia VL puede comprender la secuencia que se muestra como SEQ ID No. 19 con una o más mutaciones, tales como mutaciones revertidas. La secuencia VL puede comprender 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2 o 1 mutación en comparación con la secuencia de región marco humana tipo silvestre. Por ejemplo, la secuencia VL puede comprender una de las secuencias mostradas como SEQ ID No. 20 a 34. Las secuencias CDR están subrayadas y las mutaciones revertidas se muestran en negritas.

SEQ ID No. 20
DIVMTQSPLSLPVT**L**GE**Q**ASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVSNRFPGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY**F**CSQSTHVPYTFG**G**GTKLEIK

SEQ ID No. 21
DIVMTQSPLSLPVT**L**GE**Q**ASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVSNRFPGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY**F**CSQSTHVPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID No. 22
DIVMTQSPLSLPVT**L**GE**Q**ASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVSNRFPGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFG**G**GTKLEIK

SEQ ID No. 23
DIVMTQSPLSLPVT**L**GE**Q**ASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVSNRFPGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID No. 24
DIVMTQSPLSLPVT**L**GEPASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVSNRFPGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY**F**CSQSTHVPYTFG**G**GTKLEIK

SEQ ID No. 25

DIVMTQSPLSLPVT**L**GEPASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVSNRFPGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV**F**YCSQSTHVPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID No. 26

DIVMTQSPLSLPVT**L**GEPASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVSNRFPGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFG**G**GTKLEIK

SEQ ID No. 27

DIVMTQSPLSLPVT**L**GEPASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVSNRFPGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID No. 28

DIVMTQSPLSLPVTPGE**Q**ASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVSNRFPGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY**F**CSQSTHVPYTFG**G**GTKLEIK

SEQ ID No. 29

DIVMTQSPLSLPVTPGE**Q**ASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVSNRFPGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY**F**CSQSTHVPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID No. 30

DIVMTQSPLSLPVTPGE**Q**ASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVSNRFPGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFG**G**GTKLEIK

SEQ ID No. 31

DIVMTQSPLSLPVTPGE**Q**ASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVSNRFPGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID No. 32

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVSNRFPGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY**F**CSQSTHVPYTFG**G**GTKLEIK

SEQ ID No. 33

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVSNRFPGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY**F**CSQSTHVPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID No. 34

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVSNRFPGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFG**G**GTKLEIK

El dominio de unión a antígeno anti-TRBC1 puede comprender:
a) un dominio VH el cual comprende CDR JOVI-1 VH con el marco humano H-AF062256 o una variante del mismo; y
b) un dominio VH el cual comprende CDR JOVI-1 VL con el marco humano 3aaz o una variante del mismo.

La variante puede tener 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2 o 1 mutación en comparación con la secuencia de región marco humana tipo silvestre.

El dominio VH puede comprender la secuencia que se muestra como SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 17 o SEQ ID No. 18. El dominio VL puede comprender la secuencia que se muestra como SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 22, SEQ ID No. 23, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 34

El dominio de unión a antígeno anti-TRBC1 puede comprender:
a) un dominio VH el cual comprende la secuencia que se muestra como SEQ ID NO: 9; y
b) un dominio VH el cual comprende la secuencia que se muestra como SEQ ID NO: 19.

ANTICUERPO

El dominio de unión a antígeno del primer aspecto de la invención puede ser un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo terapéutico, tal como un anticuerpo de agotamiento. El anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico el cual une TRBC1 junto con otro antígeno. El anticuerpo puede, por ejemplo, ser un anticuerpo de reorientación por doble afinidad.

El término ‘anticuerpo de agotamiento’ se utiliza en sentido convencional para relacionarse con un anticuerpo que se une a un antígeno (es decir TRBC1) presente en una célula objetivo T y que 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 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 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 anticuerpo puede ser una molécula de inmunoglobulina completa o una parte de la misma tal como un fragmento Fab, F(ab)’2, Fv, Fv de cadena sencilla (ScFv) y fusión de scFv-Fc o diacuerpo, triacuerpo o nanocuerpo el cual retiene la especificidad del antígeno del anticuerpo completo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo bifuncional. El anticuerpo puede ser no humano, quimérico, humanizado o totalmente humano.

CONJUGADOS

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

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

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. 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 IFNα, IL-2, G-CSF y GM-CSF; complejos de coordinación de platino tales como cisplatina y carboplatina, antracenedionas, urea sustituida tal como hidroxiurea, derivados de metilhidrazina que incluye N-metilhidrazina (MIH) y procarbazina, supresores adrenocorticales tales como mitotano (o,p’-DDD) y aminoglutetimida; hormonas y antagonistas que incluyen 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 que incluyen 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.

Un conjugado anticuerpo-fármaco específico a TRBC1 permite la liberación orientada de una entidad quimioterapéutica a las células que expresan TRBC1.

ACOPLADORES BIESPECÍFICOS DE CÉLULAS T

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)).

La presente invención por lo tanto provee de una molécula biespecífica que reconoce selectivamente a TRBC1 y es capaz de activar una célula T. Por ejemplo, el agente puede ser un BiTE. El agente puede comprender:

(i) un primer dominio el cual une TRBC1, que tiene un dominio de unión antigénico como se definió antes; 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 dominios similares a las de una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8.

RECEPTOR ANTIGÉNICO QUIMÉRICO (CAR)

La presente invención proporciona un CAR el cual reconoce de manera selectiva TRBC1.

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 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 coestimuladora adicional. Por ejemplo, el 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 CD28 y el endodominio OX40 y CD3-Zeta.

De manera alternativa, el CAR del segundo aspecto de la invención puede carecer de un dominio de señalización intracelular, pero puede ser capaz de asociarse con una molécula separada la cual proporciona la funcionalidad de señalización.

Los sistemas de señalización han sido descritos previamente que comprenden dos partes: un CAR, el cual comprende el dominio de unión a antígeno y un dominio transmembranal; y un componente de señalización intracelular el cual comprende un dominio de señalización intracelular. Uno o más dominios de estimulación conjunta pueden estar ubicados en el CAR y/o en el componente de señalización intracelular.

La heterodimerización entre el CAR y el componente de señalización intracelular produce un sistema CAR funcional. La heterodimerización puede tener lugar de manera espontánea, como se describe en WO2016/124930; o puede tener lugar solo en presencia de un inductor de dimerización químico (CID), como se describe en WO2015/150771. En una tercera alternativa, la heterodimerización se interrumpe por la presencia de un agente, tal como una molécula pequeña particular, de forma que la señalización mediada por CAR solo tiene lugar en ausencia del agente. Tal sistema se describe en WO2016/030691.

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 naciente se dirija al retículo endoplásmico y, subsecuentemente, a la superficie celular donde se expresa.

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 de la membrana. Un espaciador flexible permite que el dominio de unión a TRBC se oriente en diferentes direcciones para habilitar la unión de TRBC.

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.

ÁCIDO NUCLEICO

La presente invención además proporciona un ácido nucleico que codifica un BiTE o CAR como se definió antes.

Como se utilizan en el presente documento, los términos "polinucleótido", "nucleótido" y "ácido nucleico" tienen la finalidad de ser 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 aquí descritos, 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. En la técnica se conoce una serie de diferentes tipos de modificaciones para oligonucleótidos. Estas 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 que se describe en la presente, se entenderá que los polinucleótidos pueden modificarse por cualquier método disponible en la técnica. 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.

La presente invención también proporciona un constructo de ácido nucleico el cual comprende un primer ácido nucleico que codifica un CAR como se definió antes; y un segundo ácido nucleico que codifica un gen suicida.

Los genes suicidas adecuados para utilizar en una célula que expresa CAR de la invención incluyen RQR8, el cual se describe en WO2013/153391; y RapCasp9, los cuales se describen en WO2016/135470.

En la construcción de ácidos nucleicos descrita antes, la primera y segunda secuencias de ácidos nucleicos puede estar en cualquier orden.

VECTOR

La presente invención también proporciona un vector, o equipo de vectores que comprenden una o más secuencias de ácidos nucleicos o la construcción o construcciones de ácidos nucleicos de la invención. Este vector se puede utilizar para introducir la o las secuencias de ácidos nucleicos o construcción o construcciones dentro de una célula hospedadora, por ejemplo, con el fin de que exprese un CAR que tenga un dominio de unión a antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

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.

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

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.

La célula puede comprender un ácido nucleico, una construcción de 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 (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, que incluyen 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, que incluyen 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 encefalomielitis 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 central (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.

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 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.

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.

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.

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

Las células T o NK que expresan el CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención, pueden crearse ya sea *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 de sangre periférica de un donante sin relación (3ª parte).

De manera alternativa, 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.

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

La célula que expresa 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.

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.

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.

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

La presente invención también se relaciona con una composición farmacéutica que contiene una entidad terapéutica tal como una célula que expresa CAR, un anticuerpo terapéutico o un conjugado del mismo, o un acoplador biespecífico de células T de la presente 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 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.

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 de la enfermedad.

El método de la presente invención se puede utilizar 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 TRBC1.

El método de la presente invención se puede utilizar para tratar un linfoma de células T en el cual la célula T maligna expresa un TCR que comprende una TRBC1. 'Linfoma' se utiliza en la presente descripción de acuerdo con su significado estándar para referirse a un cáncer que se desarrolla típicamente en 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 linfoadenopatía, aunque los síntomas secundarios (B) pueden incluir fiebre, bochornos, pérdida de peso, pérdida de apetito, fatiga, dificultad respiratoria y comezón.

El método de la presente invención se puede utilizar para tratar una leucemia de células T en la cual la célula T maligna expresa un TCR que comprende una TRBC1. '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.

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.

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 entremeterse 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.

La clasificación de la OMS utiliza atributos morfológicos e inmunofenotípicos en conjunto con aspectos clínicos y en algunos casos a 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, que incluye su distribución celular, algunos aspectos de la morfología e incluso hallazgos clínicos asociados.

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%).

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-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, que incluyen 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 αβ 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 linfoadenopatía 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 esfacela 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 se puede subdividir 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 linfoadenopatía, 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.

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.

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.

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.

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%).

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 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)

El HSTL es una neoplasia sistémica agresiva, por lo general derivada de células T citotóxicas γδ del sistema inmune innato, sin embargo, también puede derivarse de células T αβ 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.

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 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.

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 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 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.

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, linfoadenopatía; y

Tumor: Propenso a ulceración.

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

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.

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.

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 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 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 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 TRBC1.

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 extraer el número de células T clonales que expresan TRBC1.

La invención se describirá ahora además por medio de Ejemplos, los cuales pretenden servir para a ayudar a una persona de habilidad ordinaria en la técnica a llevar a cabo la invención, y de ninguna manera se pretende que limiten el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Selección de injerto de cadena pesada y ligera

Se construyeron dominios VH humanizados con los CDR JOVI-1 VH siguiendo marcos VH humanos: H-AF062256, H-EF177999, H-KF688165. Los dominios VL humanizados se construyeron con el marco humano 3aaz.

Los anticuerpos fueron creados ya sea con dominio VH humanizado y el dominio JOVI-1 VL múrido; el dominio VH múrido y un dominio VL humanizado; o un dominio VH humanizado y un dominio VL humanizado (véase la Figura 4).

La unión a TRBC1 se comprobó mediante ELISA y los resultados se muestran en la Figura 5.

Todas las combinaciones quiméricas y de unión humanizadas se encontraron que eran capaces de unir TRBC1 y la unión fue similar al anticuerpo quimérico que tenía dominios VH y VL.

Ejemplo 2 - Producción y comprobación de construcciones de mutación revertida

Una serie de uniones de mutación revertidas para marco humano H-AF062256 fueron creadas, como se muestra en la Tabla 1, en la cual las mutaciones revertidas se muestran en negritas.

Tabla 1

Construcción	**Cadena pesada**	**Cadena pesada Mutaciones**
Jovi Humano 8	H-AF 1	Q3, V20, M48, R71, T73
Jovi Humano 16	H-AF 2	Q3, V20, M48, R71, **K73**
Jovi Humano 17	H-AF 3	Q3, V20, M48, **S71**, T73
Jovi Humano 18	H-AF 4	Q3, V20, M48, **S71, K73**
Jovi Humano 19	H-AF 5	Q3, V20, **I48**, R71, T73
Jovi Humano 20	H-AF 6	Q3, V20, **I48**, R71, **K73**
Jovi Humano 21	H-AF 7	Q3, V20, **I48, S71**, T73
Jovi Humano 22	H-AF 8	Q3, V20, **I48, S71, K73**
Jovi Humano 23	H-AF 9	Q3, **M20**, M48, R71, T73
Jovi Humano 24	H-AF 10	Q3, **M20**, M48, R71, **K73**
Jovi Humano 25	H-AF 11	Q3, **M20**, M48, **S71**, T73
Jovi Humano 26	H-AF 12	Q3, **M20,** M48, **S71, K73**
Jovi Humano 27	H-AF 13	Q3, **M20, I48**, R71, T73
Jovi Humano 28	H-AF 14	Q3, **M20, I48,** R71, **K73**
Jovi Humano 29	H-AF 15	Q3, **M20, I48, S71,** T73
Jovi Humano 30	H-AF 16	Q3, **M20, I48, S71, K73**
Jovi Humano 31	H-AF 17	**R3,** V20, M48, R71, T73
Jovi Humano 32	H-AF 18	**R3,** V20, M48, R71, **K73**

Jovi Humano 33	H-AF 19	**R3,** V20, M48, **S71,** T73
Jovi Humano 34	H-AF 20	**R3,** V20, M48, **S71, K73**
Jovi Humano 35	H-AF 21	**R3,** V20, **I48,** R71, T73
Jovi Humano 36	H-AF 22	**R3,** V20, **I48,** R71, **K73**
Jovi Humano 37	H-AF 23	**R3,** V20, **I48, S71**, T73
Jovi Humano 38	H-AF 24	**R3,** V20, **I48, S71, K73**
Jovi Humano 39	H-AF 25	**R3, M20,** M48, R71, T73
Jovi Humano 40	H-AF 26	**R3, M20,** M48, R71, **K73**
Jovi Humano 41	H-AF 27	**R3, M20,** M48, **S71,** T73
Jovi Humano 42	H-AF 28	**R3, M20,** M48, **S71, K73**
Jovi Humano 43	H-AF 29	**R3, M20, I48,** R71, T73
Jovi Humano 44	H-AF 30	**R3, M20, I48,** R71, **K73**
Jovi Humano 45	H-AF 31	**R3, M20, I48, S71,** T73
Jovi Humano 46	H-AF 32	**R3, M20, I48, S71, K73**

Las uniones tenían un dominio VL humanizado que comprende el marco 3aaz.

La unión a TRBC1 y TRBC2 se comprobaron mediante ELISA y los resultados se muestran en la Figura 6. Todos los constructos unen a TRBC1, pero no a TRBC2 y muestran un EC50 similar al anticuerpo quimérico que tiene dominios VH y VL (Jovi-Mu). Esto muestra que posterior al injerto de CDR, la especificidad y afinidad del anticuerpo murino es retenida en los anticuerpos humanizados.

Ejemplo 3 - Investigar la estabilidad de mAbs y scFvs humanizados

La estabilidad de las uniones descritas en el Ejemplo 2 fue comprobada mediante fluorimetría de barrido diferencial. Las proteínas fueron almacenadas en PBS a 150 ug/ml previo a la adición del tinte sypro orange a una proporción proteína:tinte de 5000:1. Las soluciones fueron mezcladas y colocadas en una máquina qPCR y se corrieron en modo FRET. Las soluciones se mantuvieron a 15 ºC durante 10 minutos seguido por un aumento de temperatura a 95 ºC con aumentos de 0.5 ºC y una pausa de 30 seg. en cada etapa. Se obtuvo una lectura de

fluorescencia después de cada etapa. Para obtener el valor Tm (constante de equilibrio; proteína sin plegar = proteína plegada) la primera derivada del cambio en la fluorescencia (ΔRFU/Δ°C) se graficó contra el cambio en la temperatura (Δ°C).

Los resultados se muestran en la Figura 7. Se encontró que el uso del marco humano aumenta la estabilidad de la unión en un formato mAb.

Se condujo un experimento similar para investigar la estabilidad de las uniones equivalentes en un formato de scFv. Para este estudio, se utilizó colorimetría de barrido diferencial. Los experimentos se llevaron a cabo mediante el uso del sistema CAP DSC. Las proteínas en solución amortiguadora de almacenamiento (1 x PBS) se colocaron en la celda de muestra del calorímetro y la celda de referencia se llenó con la solución amortiguadora de almacenamiento sola. Las celdas se estabilizaron dentro del calorímetro durante 1 hora a 25 ºC antes de calentarlas hasta la temperatura final de 100 ºC a una proporción de 200 ºC por hora. La temperatura de desnaturalización, Tm, que corresponde al máximo del pico de transición, se determinó a partir de al menos dos corridas de réplica y no variaron más de 0.25 ºC.

Los resultados para una comparación de la unión del scFV se muestran en la Figura 8. La temperatura de fusión del scFv Jovi-1 de ratón fue de 61 ºC, considerando que la temperatura de fusión para el scFv (H-AF1, 3aaz) fue de 65 ºC.

Ejemplo 4 - Generación de un receptor antigénico quimérico (CAR) con un dominio de unión a antígeno anti-TRBC1 humanizado

Un CAR de segunda generación se diseñó para tener un endodominio 41BB y CD3 zeta y un dominio de unión a antígeno que comprende un scFv JOVI-1 humanizado (H-AF1, 3aaz) como se ilustró de manera esquemática en la Figura 9. Las células T humanas primarias de donadores normales fueron transducidas con vectores retrovirales que expresan el CAR anti-TRBC1 o un CAR EGFRvIII irrelevante como control negativo. La capacidad de las células para eliminar ya sea a células objetivo que expresen TRBC1 o TRBC2 fueron investigadas mediante el uso de citometría de flujo.

Los resultados se muestran en la Figura 10. Las células T que expresaban el CAR TRBC1 humanizado eliminaron a las células objetivo que expresaban TRBC1, pero no a las que expresaban TRBC2.

La proliferación de células T se midió después de 72 horas de cultivo conjunto con células objetivo que expresaban TRBC1 o TRBC2 y los resultados se muestran en la Figura 11. Las células T que expresaban ya fuese CAR Jovi-1 múrido o el CAR humanizado mostraron un aumento en la proliferación cuando se cultivaron en conjunto con las células objetivo que expresaban TRBC1, pero no con las que expresaban TRBC2.

La liberación de citoquinas se midió después de 24 horas de cultivo conjunto con objetivos que expresaban TRBC1 o TRBC2. Los resultados se muestran en la Figura 12. Las células T que expresaban ya fuese CAR Jovi-1 múrido o el CAR humanizado mostraron un aumento en la liberación de IFNγ y IL-2 cuando se cultivaron en conjunto con las células objetivo que expresaban TRBC1, pero no con las que expresaban TRBC2.

Ejemplo 5 - CAR αTRBC1 humanizado limpia el tumor en el modelo de ratón NSG

Ratones NSG hembra, de 7 a 8 semanas de edad, fueron implantadas con células Jurkat transducidas para expresar CD19-Fluc (3x106 células por animal en 0.1 ml PBS). En el día 7, los ratones hembra (n=8/grupo) recibieron infusiones intravenosas de células T CAR aTRBC1 1.0 x 106 o de células transducidas simuladas (NT). El crecimiento tumoral se verificó en los días de estudio 6, 9, 12, y 15 mediante imagen de bioluminiscencia (BLI). Brevemente, los ratones hembra fueron inyectados (s.c.) con 150 mg/kg de D-Luciferina 15 minutos antes de la imagen. 10 minutos posteriores a la administración de la D-Luciferina los ratones hembra fueron anestesiados y colocados dentro de la cámara de imagen y se tomaron imágenes por luminiscencia (vista ventral y vista dorsal; hasta 5 ratones hembras se colocaron uno al lado del otro en orden de jaula). La duración y el agrupamiento (sensibilidad) de la adquisición de imagen se capturó y procesó mediante el uso del software Living Image 4.3.1.

Los resultados se muestran en la Figura 13. Para el día 12, las células T CAR anti-TRBC1 humanizadas habían limpiado el tumor de todos los animales.

Ejemplo 6 - Comparación del efecto de células T CAR anti-TRBC1 múridas y humanizadas ante el agotamiento

Las PBMC activadas fueron transducidas con vectores que expresan el CAR Jovi-1 múrido o un CAR Jovi-1 humanizado lo cual comprende las CDR de JOVI-1 con regiones marco VH H-AF062256 y regiones marco VL 3aaz. Las células fueron recolectadas después de dos días y se mantuvieron en medio de cultivo con 50 U/mL IL-2 por dos días adicionales. Las células T transducidas fueron extraídas de células que expresaban CD56 mediante el uso del equipo de

selección positiva EasySep CD56. Los cultivos conjuntos de objetivos Raji que expresaban TRBC1-TCR con células T CAR se llevaron a cabo como sigue: las células objetivo se colocaron en una placa a 50,000 células por pocillo a una proporción efector:objetivo de 1:1 en placas de 96 pocillos con fondo en U. Después de 96 horas, los cultivos conjuntos fueron cosechados y las células fueron teñidas con anticuerpos anti-PD1, anti-LAG3 y anti-Tim3 y después se analizaron mediante citometría de flujo.

Los resultados se muestran en la Figura 14. Las células T que expresaban el CAR anti-TRBC1 humanizado expresaron niveles más bajos de los tres marcadores de agotamiento que las células T que expresaban el CAR múrido. Esto fue verdadero para ambas células CD4+ y CD8+. Las células T que expresaban el CAR humanizado por lo tanto se tornaron sorprendentemente menos agotadas durante la exposición a las células objetivo que las células T que expresaban un CAR con un scFv derivado del anticuerpo Jovi-1 múrido.

El agotamiento de la célula T es un estado de disfunción de la célula T lo cual surge durante muchas infecciones crónicas y cáncer. Se define por función pobre del efector. Con el fin de que una célula CAR-T se convirtiera en eficiente para eliminar células objetivo, resulta favorable evitar o reducir la tasa de agotamiento de la célula T.

Todas las publicaciones mencionadas en la especificación anterior se incorporan en este documento por su referencia. Diversas modificaciones y variaciones de los métodos y sistema descritos de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica, sin apartarse del alcance y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con modalidades preferidas específicas, se entenderá que la invención, como se reclama, no debe limitarse indebidamente a esas modalidades específicas. En efecto, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención, las cuales son obvias para los expertos en biología molecular o campos relacionados, estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.