



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **3 024 357**

⑮ Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2018** PCT/US2018/018557
⑦ Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2018** WO18152451
⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2018** E 18754879 (7)
⑨ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2025** EP 3583218

④ Título: **Suministro de fármacos basado en ligando-carga útil dirigido para la terapia celular**

⑩ Prioridad:

17.02.2017 US 201762460118 P

⑤ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.06.2025

⑬ Titular/es:

PURDUE RESEARCH FOUNDATION (100.00%)
101 Foundry Drive Suite 2500
West Lafayette, IN 47906, US

⑭ Inventor/es:

LOW, PHILIP S.;
SRINIVASARAO, MADDURI y
ZHANG, BONING

⑯ Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 024 357 T3

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

DESCRIPCIÓN

Suministro de fármacos basado en ligando-carga útil dirigido para la terapia celular

5 Campo de la invención

Esta descripción proporciona una plataforma de suministro de fármacos para la terapia celular. Particularmente, una proteína manipulada genéticamente se acopla con un ligando de alta afinidad que porta al menos una carga útil de fármaco a internalizar por la célula trasplantada a través de la proteína manipulada genéticamente 10 para regular los efectos de la terapia con células trasplantadas.

Antecedentes

15 En las últimas décadas, se han hecho grandes avances en este campo con respecto a los tipos de células, los métodos de suministro y los modelos de enfermedades adecuados. En términos de tipos de células, las terapias celulares actuales pueden clasificarse aproximadamente como receptores de antígenos quiméricos (CAR), células para modelos de tumores y medicina regenerativa basada en células madre.

20 Los CAR T también conocidos como receptores de linfocitos T quiméricos, inmunorreceptores quiméricos o receptores de linfocitos T artificiales, permiten que las células efectoras inmunitarias (generalmente linfocitos T o células NK) reconozcan células diana con el antígeno correspondiente y ejerzan su actividad citotóxica. La aparición y el desarrollo de la tecnología CAR-T es prometedora para ciertos tipos de cáncer, lo que convierte a CAR-T en una superestrella en el campo de la investigación biomédica y los estudios clínicos.

25 La medicina regenerativa es un área de la medicina que cambia las reglas del juego con el potencial de curar completamente los tejidos y órganos dañados, ofreciendo soluciones y esperanza a las personas que tienen afecciones que hoy están más allá de la reparación. Los avances en biología del desarrollo y celular, inmunología y otros campos han desbloqueado nuevas oportunidades para refinar las terapias regenerativas existentes y desarrollar otras nuevas. Zhou y Brenner (Exp. Hematol. (2016)44: 1013-1019) se refieren a 30 mejorar la seguridad de las terapias con linfocitos T mediante el uso de un gen de caspasa-9 inducible. Xia y Low (J. Med. Chem. (2010) 53: 6811-6824) se refieren a terapias dirigidas al folato para el cáncer.

35 Las células madre tienen la capacidad de desarrollarse, a través de un proceso llamado diferenciación, en muchos tipos diferentes de células, tales como células de la piel, células del cerebro, células pulmonares, etc. Las células madre son un componente clave de la medicina regenerativa, ya que abren la puerta a nuevas aplicaciones clínicas.

40 Una variedad de células madre, que incluye las células madre adultas y embrionarias, pueden usarse en medicina regenerativa. Además, en la medicina regenerativa se usan varios tipos de células progenitoras, tales como las que se encuentran en la sangre del cordón umbilical, y células biomanipuladas genéticamente 45 llamadas células madre pluripotentes inducidas. Cada tipo tiene cualidades únicas, y algunos son más versátiles que otros.

45 Muchas de las terapias regenerativas en desarrollo comienzan con las propias células del paciente particular. Por ejemplo, las propias células de la piel de un paciente pueden recogerse, reprogramarse en un laboratorio para darles ciertas características y devolverse al paciente para tratar su enfermedad.

50 Aunque el CAR T anti-CD19 ha tenido un gran éxito en las aplicaciones clínicas para el tratamiento de la leucemia, los efectos secundarios mortales tales como la tormenta de citocinas generada por la rápida lisis de las células tumorales, así como también la destrucción de las células B normales CD19+ por el CAR T anti-CD19 de proliferación rápida requieren un control más fino de la célula CAR T. En la terapia regenerativa basada en células madre, se han realizado esfuerzos para comprender mejor el proceso de diferenciación y 55 los roles tróficos de las células trasplantadas en el tejido diana. Mientras tanto, estos procesos pueden alterarse potencialmente por algunos fármacos de molécula pequeña que se suministran específicamente a la célula madre para contribuir además a la regeneración del tejido diana.

60 Otra preocupación duradera sobre las células CAR T, así como también sobre otras terapias regenerativas basadas en células madre, es el potencial tumorigénico de estas células trasplantadas. En resumen, será ideal tener una puerta privada para controlar la actividad de la célula trasplantada, ya sea célula CAR T o célula madre, después de que se trasplante.

Resumen de la invención

65 La presente invención proporciona una plataforma de suministro de fármacos como se reivindicó en las reivindicaciones.

Por ejemplo, esta descripción proporciona una plataforma de suministro de fármacos para afinar la terapia celular. El sistema de suministro de fármacos comprende:

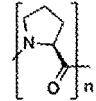
- 5 a. una proteína manipulada genéticamente en una célula diana para trasplante, en donde la proteína manipulada genéticamente comprende un primer componente y un segundo componente, el primer componente y el segundo componente se conectan mediante un enlazador peptídico, el primer componente es una proteína que no es de membrana, el segundo componente es un péptido o proteína anclado a la membrana;
- 10 b. al menos un ligando pequeño conjugado a un enlazador, en donde el al menos un ligando pequeño tiene afinidad intrínseca alta por al menos un componente de la proteína manipulada genéticamente; y
- 15 c. al menos una carga útil del fármaco conjugado al enlazador, en donde la carga útil de fármaco se asocia con la célula diana cuando el ligando pequeño se une a al menos un componente de la proteína manipulada genéticamente.
- 20 En algunas modalidades, la plataforma de suministro de fármacos mencionada anteriormente tiene una carga útil de fármaco del agente de obtención de imágenes. Tal agente de obtención de imágenes se puede seleccionar del grupo que consiste en el colorante fluorescente rodamina, la fluoresceína y S0456. Alternativamente, tal agente de obtención de imágenes se selecciona del grupo que consiste en restos de obtención de imágenes quelantes de radioisótopos, cabeza quelante EC 20, NOTA y DOTA.
- 25 En algunas modalidades, la plataforma de suministro de fármacos mencionada anteriormente tiene una carga útil de fármaco de fármaco citotóxico. Tal fármaco citotóxico puede seleccionarse del grupo que consiste en tubulisina, DM1, DM4 y una auristatina.
- 30 En algunas modalidades, la plataforma de suministro de fármacos mencionada anteriormente tiene una carga útil de fármaco de un modulador de la expresión génica.
- 35 En algunas modalidades, la plataforma de suministro de fármacos mencionada anteriormente tiene una carga útil de fármaco de modulador de la actividad celular.
- 40 En algunas modalidades, el modulador mencionado anteriormente puede seleccionarse del grupo de dasatinib, inhibidor de MEK1/2 e inhibidor de PI3K; grupo de inhibidor de HDAC, inhibidor de cinasa e inhibidor metabólico; grupo de inhibidor de GSK3 beta, inhibidor de MAO-B e inhibidor de Cdk5.
- 45 En algunas modalidades, el modulador mencionado anteriormente es un inhibidor de fosfatasa, un agonista de ROR γ t o un ARNip de mi181a1.
- 50 En algunas modalidades, la carga útil de fármaco mencionada anteriormente es un inhibidor de fosfatasa, que incluye, pero no se limita a, inhibidores contra SHP1/2, TC-PTP.
- 55 En algunas modalidades, la carga útil de fármaco mencionada anteriormente en la plataforma de suministro de fármaco se internaliza además por la célula diana cuando el ligando pequeño se une a al menos un componente de la proteína manipulada genéticamente.
- 60 En algunas modalidades, la plataforma de suministro de fármacos mencionada anteriormente tiene un enlazador liberable para conectar el ligando pequeño y el fármaco de carga útil. El enlazador puede seleccionarse del grupo que consiste en



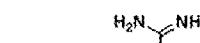
alquilo

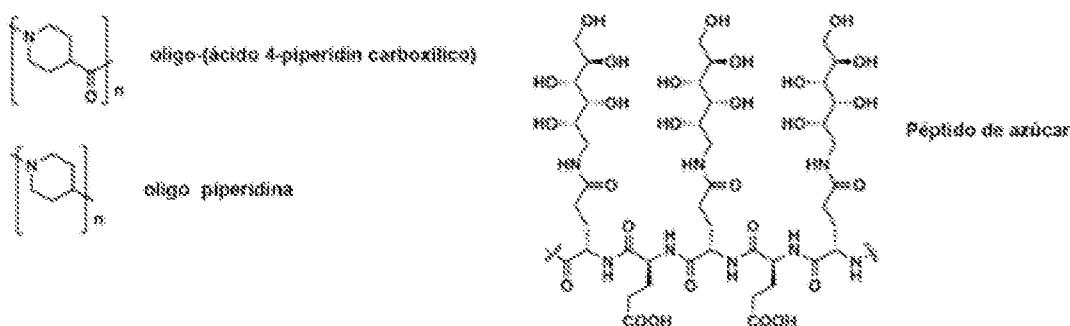


polietilenglicol (PEG)



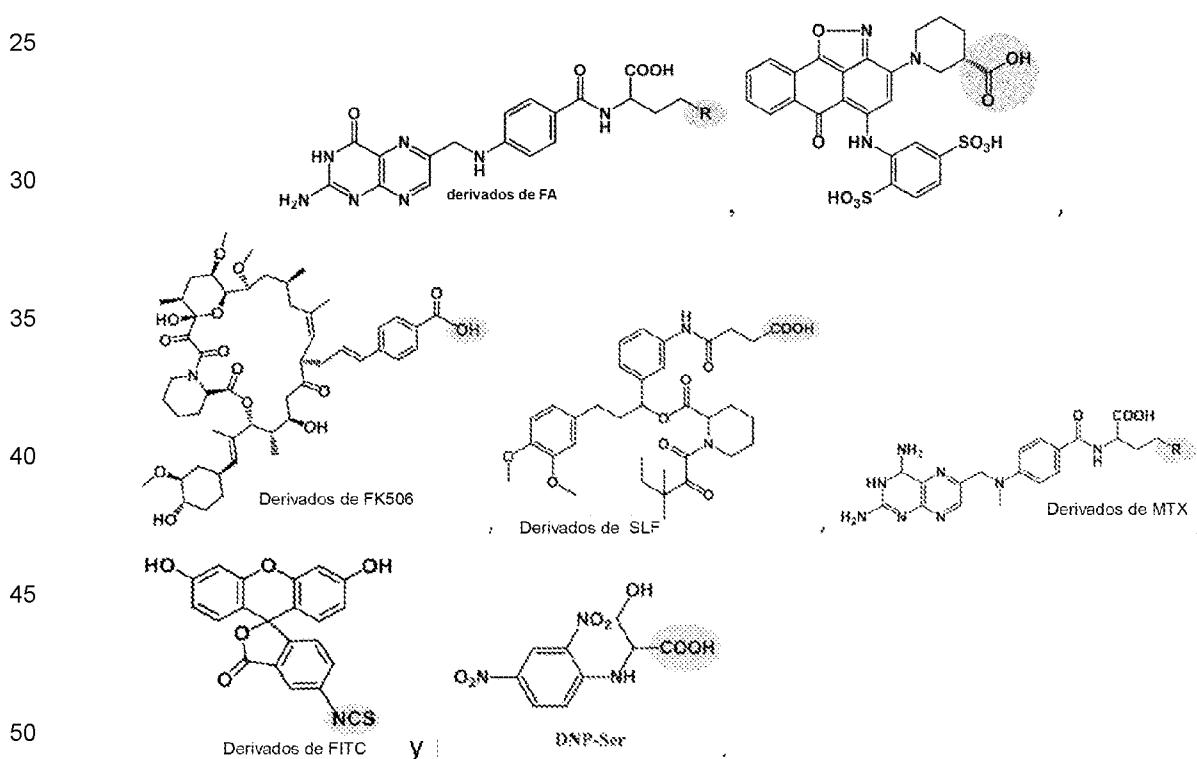
poliprolina





15 En algunas modalidades, los componentes proteicos manipulados genéticamente mencionados anteriormente se seleccionan del grupo que consiste en el receptor de folato alfa (FR α), receptor de folato beta (FR β), receptor de uroquinasa (uPAR), proteína de unión a FK506 (FKBP), dihidrofolato reductasa (DHFR), fragmento variable de cadena simple contra isotiocianato de fluoresceína (scFv contra FITC) y fragmento variable de cadena simple contra dinitrofenol (scFv contra DNP).

20 En algunas modalidades, el ligando pequeño mencionado anteriormente se selecciona del grupo que consiste en



55 En algunas modalidades, la plataforma de suministro de fármacos mencionada anteriormente tiene el primer componente como FKBP, el segundo componente es un péptido que confiere un ancla de glicosilfosfatidil inositol (GPI) en el primer componente, y el ligando pequeño es FK506 o su derivado. En algunas modalidades, el derivado de FK506 suprime el sitio de unión a calcineurina.

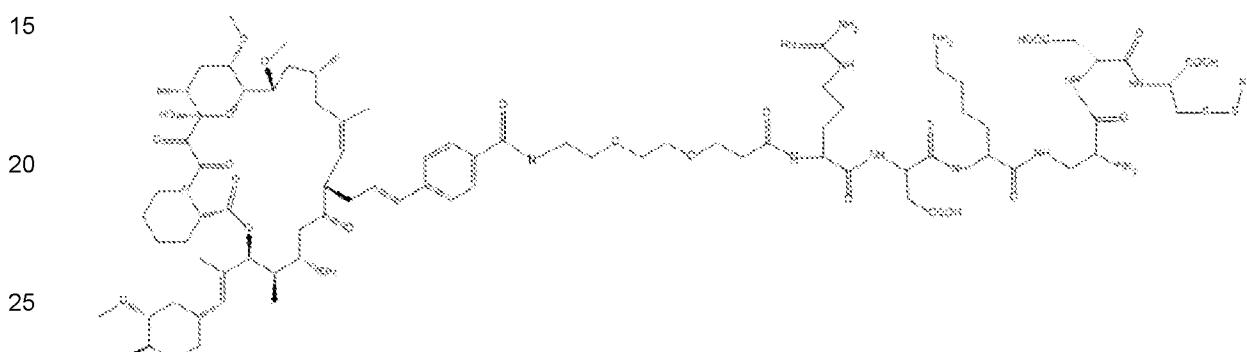
60 En algunas modalidades, el segundo componente mencionado anteriormente es un receptor de folato (FR) de longitud completa o truncada.

En algunas modalidades, la plataforma de suministro de fármacos mencionada anteriormente tiene al menos un segmento de enlazador peptídico flexible SGGS para conectar el primer componente y el segundo componente de la proteína manipulada genéticamente.

En algunas modalidades, la plataforma de suministro de fármacos mencionada anteriormente comprende una proteína manipulada genéticamente seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:1-2 (secuencia de aminoácidos para FKBP-FRa de ratón y secuencia de aminoácidos para FKBP-FRa humano respectivamente).
 5 En algunas modalidades, la plataforma de suministro de fármacos mencionada anteriormente comprende una proteína manipulada genéticamente seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:12-15.

En algunas modalidades, la célula diana para el trasplante mencionada anteriormente es una célula inmunitaria. Por ejemplo, la célula inmunitaria puede ser una célula NK o un linfocito T con receptor de antígeno quimérico (CAR T). Tal célula CAR T puede expresar una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 3-10 4.

En algunas modalidades, la plataforma de suministro de fármacos mencionada anteriormente tiene el conjugado de ligando pequeño con fórmula I.



En algunas modalidades, la plataforma de suministro de fármacos mencionada anteriormente tiene una célula diana para trasplante como una célula CAR T que expresa la SEQ ID NO:3 (secuencia de aminoácidos para el constructo CAR T antiCD19 de ratón) o la SEQ ID NO:4 (secuencia de aminoácidos para el constructo CAR T antiCD19 humano).

En algunas modalidades, el pequeño ligando mencionado anteriormente se conjuga además a un colorante fluorescente o sonda radiactiva para rastrear la internalización del fármaco.

En algunas modalidades, la plataforma de suministro de fármacos mencionada anteriormente comprende un ligando pequeño que se conjuga además a un regulador de la expresión génica endógena de un regulador de la expresión génica transducida.

En algunas modalidades, la plataforma de suministro de fármacos mencionada anteriormente, la célula diana para el trasplante es una célula madre, una célula progenitora o una célula transplantada diseñada para sintetizar un compuesto bioquímico que es deficiente en un paciente.

También se describe en la presente descripción pero no se reivindica, una célula CAR T que comprende un constructo que expresa secuencias de aminoácidos seleccionadas de las SEQ ID NO:12-15.

También se describe en la presente descripción pero no se reivindica, un constructo de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:12-15.

También se describe en la presente descripción pero no se reivindica, un constructo de ADN que codifica un receptor de fusión FKBP-FRa que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:1-2 enlazadas operativamente a un promotor de EF1a en un vector de expresión. Tal vector de expresión puede ser pWPI que tiene la SEQ ID NO:5.

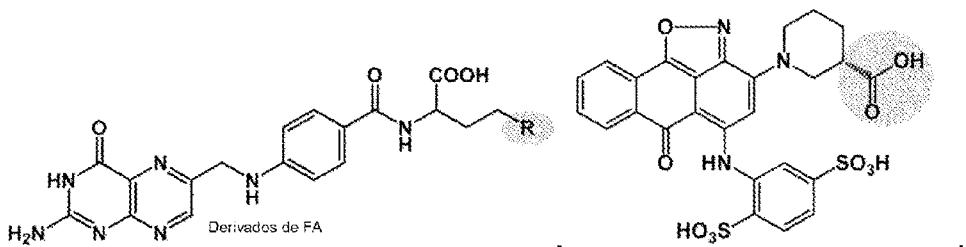
También se describe en la presente descripción pero no se reivindica, un constructo de ADN que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:6-8.

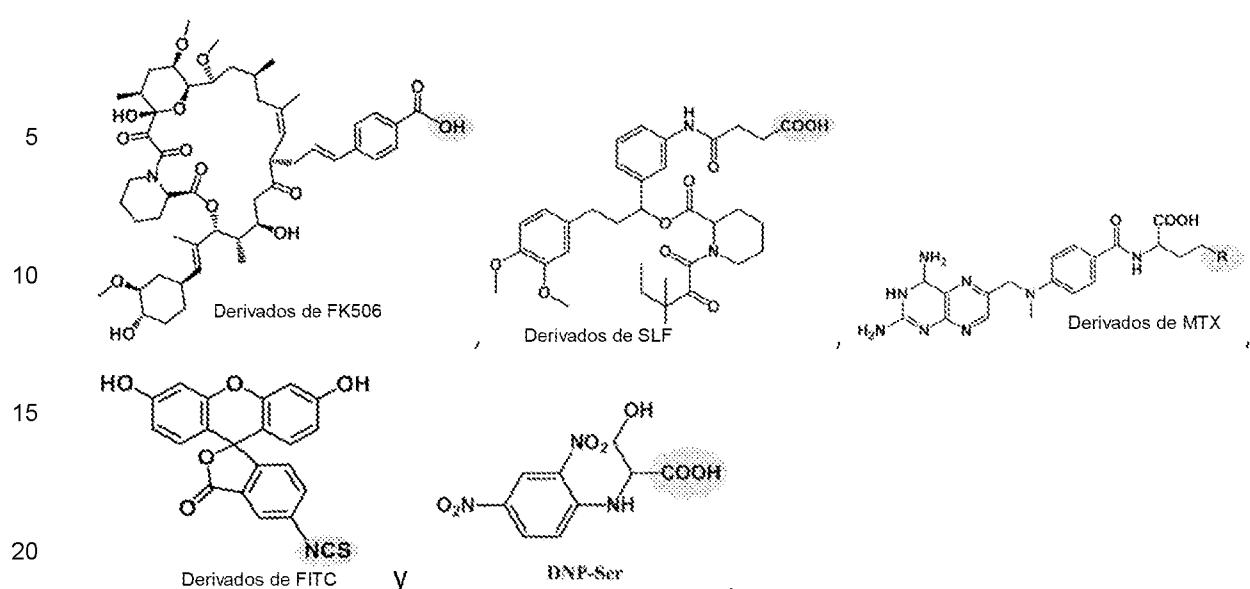
También se describe en la presente descripción pero no se reivindica, una célula transplantada que comprende los genes insertados hFKBP-FR (SEQ ID NO:7) y CAR antiCD19 humano (SEQ ID NO:9).

También se describe en la presente descripción pero no se reivindica, una célula de trasplante que comprende los genes insertados mFKBP-FR(SEQ ID NO:8) y CAR antiCD19 de ratón (SEQ ID NO:10).

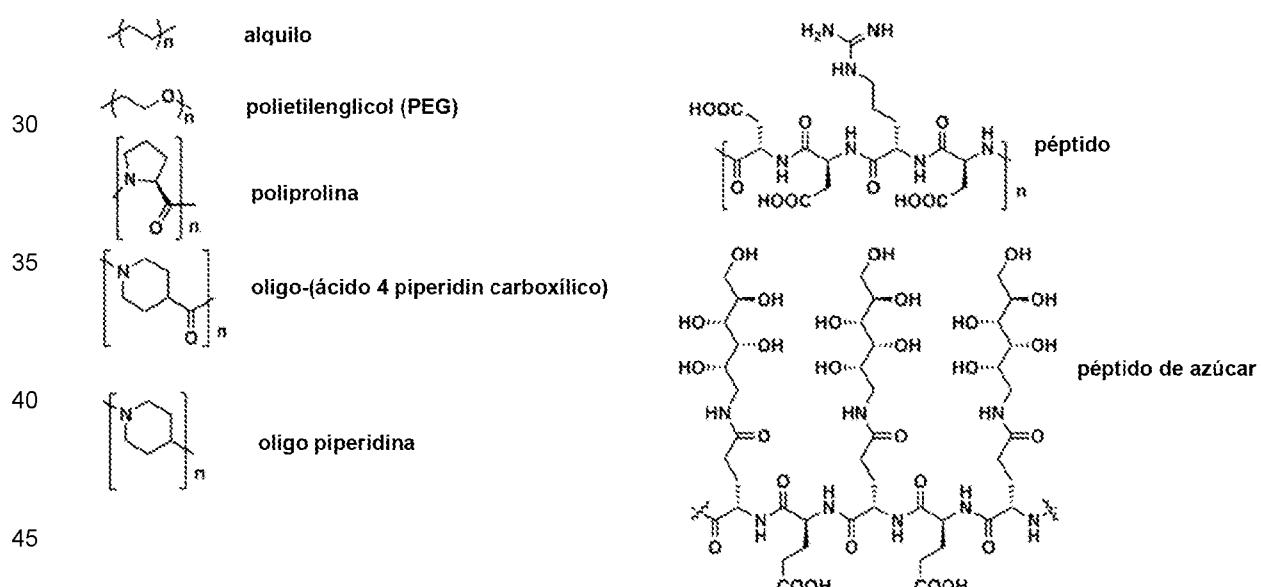
La presente invención proporciona además una plataforma de suministro de fármacos como se reivindicó en las reivindicaciones para su uso en un método de modulación de un efecto de la terapia celular. Por ejemplo, esta descripción proporciona además una plataforma de suministro de fármacos para su uso en un método para modular el efecto de la terapia celular, en donde el método comprende:

- 5 a. Identificar una célula diana para trasplante, en donde la célula diana transplantada tiene una función de terapia celular;
- 10 b. Proporcionar una proteína manipulada genéticamente en la superficie de la célula diana para el trasplante, en donde la proteína manipulada genéticamente comprende un primer componente y un segundo componente, el primer componente y el segundo componente se conectan mediante un enlazador peptídico flexible, el primer componente es una proteína que no es de membrana, el segundo componente es un péptido o proteína anclada a glicosilfosfatidil inositol (GPI);
- 15 c. Proporcionar una carga útil de conjugado de fármaco a la célula diana, en donde la carga útil de fármaco se conjuga a un ligando pequeño a través de un enlazador, y opcionalmente se conjuga a un colorante fluorescente, en donde el ligando pequeño se une a al menos un componente de la proteína de fusión manipulada genéticamente con alta afinidad y se internaliza por la célula diana junto con la carga útil de fármaco;
- 20 d. liberar el fármaco dentro de la célula diana para modular la función de terapia de la célula diana.
- 25 En algunas modalidades, la plataforma de suministro de fármacos mencionada anteriormente es para su uso en una función de terapia celular para proporcionar cirugía guiada ópticamente a un sujeto.
- En algunas modalidades, la plataforma de suministro de fármacos mencionada anteriormente es para su uso en una función de terapia celular para controlar la proliferación de células diana.
- 30 En algunas modalidades, la plataforma de suministro de fármacos mencionada anteriormente es para su uso en una función de terapia celular para ejecutar la citotoxicidad a la célula diana que se involucra en la célula cancerosa.
- 35 En algunas modalidades, la célula diana transplantada mencionada anteriormente es una célula inmunitaria. Por ejemplo, la célula diana es una célula CAR T.
- En algunas modalidades, la célula diana transplantada mencionada anteriormente es una célula madre, una célula progenitora o una célula transplantada diseñada para sintetizar un compuesto bioquímico que es deficiente en un paciente.
- 40 En algunas modalidades, la carga útil de fármaco mencionada anteriormente es un agente de obtención de imágenes seleccionado de colorante fluorescente de rodamina y FITC, o un agente de obtención de imágenes de radioisótopo seleccionado de cabeza quelante EC20, NOTA y DOTA.
- 45 En algunas modalidades, la carga útil de fármaco mencionada anteriormente es un fármaco citotóxico seleccionado del grupo que consiste en tubulisina, DM1, DM4 y auristatina.
- 50 En algunas modalidades, la carga útil de fármaco mencionada anteriormente es un modulador de la expresión génica seleccionado de inhibidores de cinasa que consiste de dasatinib, inhibidor de MEK1/2 e inhibidor de la cinasa de PI3, o un ARNip de mi181a1.
- 55 En algunas modalidades, la célula diana transplantada mencionada anteriormente comprende una proteína de fusión seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12-15.
- 60 En algunas modalidades, los componentes proteicos manipulados genéticamente mencionados anteriormente se seleccionan del grupo que consiste en FRa, FRb, uPAR, FKBP, DHFR, scFv contra FITC y scFv contra DNP.
- 65 En alguna modalidad, el ligando pequeño mencionado anteriormente se selecciona del grupo que consiste en





En algunas modalidades, el enlazador mencionado anteriormente para conectar el ligando pequeño y el fármaco de carga útil se selecciona del grupo que consiste en



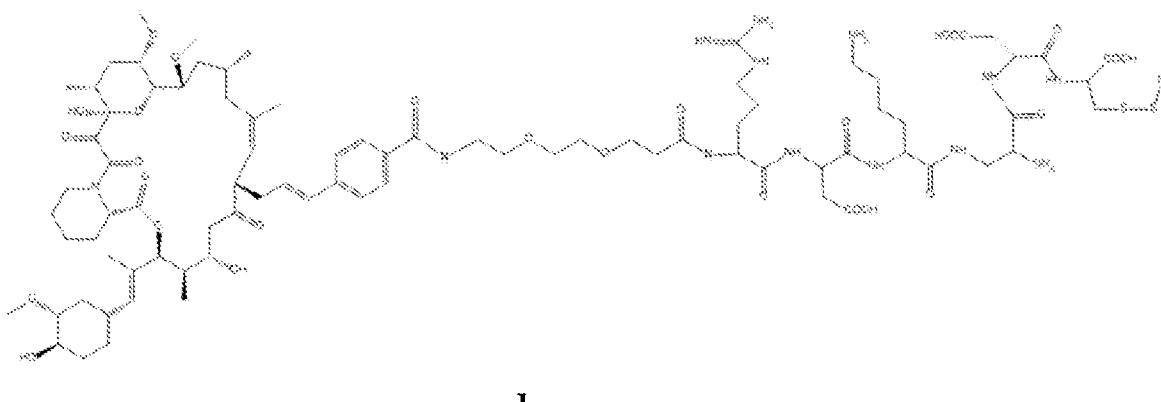
En algunas modalidades, la célula diana trasplantada mencionada anteriormente comprende una proteína de fusión FKBP-LINKER-FRa manipulada genéticamente seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO:2.

En algunas modalidades, la célula diana trasplantada mencionada anteriormente es una célula CAR T que comprende un constructo CAR T antiCD19 manipulado genéticamente seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO:3 y la SEQ ID NO:4.

En algunas modalidades, el conjugado farmacéutico mencionado anteriormente es un enlazador liberable de FK506 que comprende la fórmula I, en donde el dominio de unión de FK506 tiene una afinidad por FKBP de aproximadamente 4 pM a aproximadamente 100 pM.

60

65



En algunas modalidades, la célula diana trasplantada mencionada anteriormente es una célula CAR T y el conjugado de fármaco se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de GSK3b, inhibidor de MAPK para controlar la tormenta de citocinas excesiva de la célula CAR T trasplantada.

En algunas modalidades, la célula diana trasplantada mencionada anteriormente es una célula CAR T y el conjugado de fármaco es un modulador diseñado para controlar la proliferación de linfocitos T no deseados.

En algunas modalidades, la célula diana trasplantada mencionada anteriormente es una célula madre o célula progenitora y el conjugado de fármaco es un inhibidor de GSK3b para reforzar la reparación de fracturas óseas.

En algunas modalidades, la célula diana trasplantada mencionada anteriormente es una célula madre, una célula progenitora o una célula trasplantada diseñada para sintetizar un compuesto bioquímico que es deficiente en un paciente; y el conjugado de fármaco se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de MAO-B e inhibidor de cdk5 para tratar la enfermedad de Parkinson u otra enfermedad neurodegenerativa.

En algunas modalidades, la célula diana trasplantada mencionada anteriormente es una célula NK y el conjugado de fármaco es un agonista de ROR γ t para controlar las respuestas inmunitarias mediadas por células Th17.

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se comprenderán mejor con referencia a las siguientes figuras, descripciones y reivindicaciones asociadas.

Breve descripción de las Figuras

Figura 1: A. descripción general de la plataforma de suministro de fármacos basada en carga útil de FKBP-FRa y FK506 para la terapia celular; B. ilustración gráfica de la plataforma de la vía secreta para el suministro de carga útil de células CAR T.

Figura 2A. izquierda: estructura química de FK506 con sitios de unión a FKBP (amarillo) y sitio derivatizado (rojo) resaltados. Derecha: estructura de cocrystal del complejo ternario de un fragmento de calcineurina A (verde), calcineurina B (cian), FKBP12 (púrpura) y el FK506 (amarillo), PDB: 1TCO

Figura 2B. Varias opciones de combinación de dos módulos en una proteína de fusión manipulada genéticamente y sus respectivas opciones de ligandos, con sitios de derivatización potenciales resaltados.

Figura 3: izquierda: regulación negativa y positiva de la actividad de células CAR T, adaptado de The quest for spatio-temporal control of CAR T cells, Sun J. etc. 2015. Derecha: mecanismo de apoptosis mediada por FKBP-caspasa9 inducida por AP1903 (dímero de FK506) y la estructura de AP1903, adaptado de Inducible Apoptosis as a Safety Switch for Adoptive Cell Therapy, Malcolm K.B. etc. 2011

Figura 4: a. Mapa del vector de expresión pWPI con inserto FKBP-FRa (hFRa 1-24: rojo, FKBP: amarillo, hFRa 25-258: rojo) b. Las células K562 transducidas con FKBP-FRa muestran una banda más alta de alrededor de 50 kDa (37 kDa para FRa más 12 kDa para FKBP) en comparación con las células KB positivas para FRa y las células K562 no transducidas. c. constructo del portador de carga útil y diseño del constructo CAR T d. El diseño del constructo de FKBPFR3GS (indicado como FF3). Del extremo N terminal al extremo C terminal, tiene 1-24 aa de FRa humano como el péptido señal, proteína FKBP humana, tres enlazadores Gly-Ser y después 25-258 aa de FRa humano. En FKBPFR1GS (indicado como FF1), los tres enlazadores Gly-Ser de FF3 se sustituyen con un enlazador Gly-Ser con otras partes sin cambios. e. El diseño del constructo de 4m5.3FR. Del extremo N terminal al extremo C terminal, tiene un péptido señal hCD8, scFv del anticuerpo 4M5.3 contra FITC, enlazador GS, 25-258aa de FRa humano.

Figura 5. Interferencia entre el FR y FKBP en el receptor de fusión de FKBPF1GS. La unión del ácido de folato en la proteína de fusión FKBPF1GS bloquea la unión de FK506-rodamina a tan solo 0,01 nM y suprime totalmente la unión de FK506-rodamina a 50 nM.

5 Figura 6. La célula Jurkat FKBPF1GS muestra una intensidad de FK506-rodamina disminuida después de unirse a OTL38. FRET de FK506-rodamina (donante) a OTL38 (FA-S0456, aceptor, ex/em: 774/794 nm) dentro del receptor de fusión indica la interacción entre FR y FKBP.

10 Figura 7. El aumento de la longitud del enlazador entre FKBP y FR reduce significativamente la interferencia entre las dos partes. En comparación con FF1 (1GS entre FKBP y FR), FF3 (3GS entre FKBP y FR) conserva la unión de FK506-rodamina en presencia de FA 10 nM, que es comparable a la concentración fisiológica de FA en el cuerpo humano.

15 Figura 8. El tratamiento con PI-PLC libera el receptor de fusión FF3 anclado a GPI. El linfocito T Jurkat con receptor de fusión FF3 muestra una unión saturada con FA-FITC 20 nM (EC17), mientras que después del tratamiento con 5 mU de PI-PLC o 50 mU de PI-PLC, el FA-FITC pierde la unión a la célula, lo que indica la liberación del receptor de fusión FF3 anclado a GPI.

20 Figura 9. Curva de unión de FA-rodamina en el receptor de fusión FKBPF3GS. El receptor de fusión FKBPF3GS que se expresa de manera estable en linfocitos T humanos puede unirse al derivado de ácido de folato (FA-rodamina) con alta afinidad ($K_d=0,95$ nM), que es comparable a la afinidad de FA-rodamina en células KB FR+ (K_d alrededor de 1 nM). Por lo tanto, se conserva la propiedad de unión del FR en el receptor de fusión.

25 Figura 10. Curva de unión de FK506-rodamina en el receptor de fusión FKBPF3GS. El receptor de fusión FKBPF3GS que se expresa de manera estable en el linfocito T humano es capaz de unirse al derivado de FK506 (FK506-rodamina) con alta afinidad ($K_d=3,93$ nM), lo que significa que se conserva la propiedad de unión de FKBP en el receptor de fusión.

30 Figura 11. SLF-FITC se une al receptor de fusión FKBPF3GS con afinidad de unión relativamente alta ($K_d=62$ nM), mientras que la competencia con SLF libre (100x, preincubación) bloquea esta unión. SLF, un imitador de FK506, presenta una afinidad de unión 10 veces menor al receptor de fusión FKBPF, en comparación con el ligando parental FK506, lo cual es consistente con el informe anterior.

35 Figura 12. Curva de unión de FA-rodamina en el receptor de fusión 4M5.3FR. FA-rodamina puede unirse al receptor de fusión 4M5.3FR que se expresa de manera estable en linfocitos T humanos con alta afinidad ($K_d=2,25$ nM), que es comparable a la afinidad de FA-rodamina en células KB FR+ (K_d de alrededor de 1 nM). Por lo tanto, la propiedad de unión a FR se conserva en el receptor de fusión 4M5.3FR.

40 Figura 13. Curva de unión de FITC-AF647 en el receptor de fusión 4M5.3FR. FITC-AF647 puede unirse al receptor de fusión 4M5.3FR que se expresa de manera estable en linfocitos T humanos con alta afinidad ($K_d=8,03$ nM). 100x comp indica FITC libre de sodio. La propiedad de unión del scFv 4M5.3 con FITC se conserva en el receptor de fusión 4M5.3FR.

45 Figura 14. FA-tubulisinina es capaz de mediar un efecto de destrucción específico del receptor contra el linfocito T humano FF3+. La compensación con FA (100x preincubación con FA) bloquea el efecto. Esto implica la internalización y liberación exitosa del fármaco libre tubulisinina a través del sistema de receptores de fusión FF3.

50 Figura 15. FA-tubulisinina destruye específicamente a la población hFF3+ en un cultivo de linfocitos T humanos mixtos. El número absoluto de disminución de células hFF3+ a medida que aumenta la concentración de FA-Tub, mientras que las células hFF3 también se destruyen a través de los fármacos liberados y el efecto que resulta de estos a altas concentraciones.

55 Figura 16. SLF-Tub destruye específicamente las células Jurkat hFF3+ con una $IC_{50} = 138$ nM. Esto indica la internalización exitosa de SLF-Tub por el receptor de fusión FKBPF3GS y la liberación de la tubulisinina dentro de la célula.

60 Figura 17. Tanto FITC-DM4 como FITC-Tub pueden destruir específicamente a los linfocitos T humanos 4M5.3FR+, mientras que FITC-Tub tiene una IC_{50} más alta. La compensación de FITC libre de sodio (100x preincubación) bloquea el efecto de destrucción mediado por receptores. Esto implica la internalización y liberación exitosa del fármaco citotóxico FITC en linfocitos T a través del receptor de fusión 4M5.3FR.

65 Figura 18 FITC-tubulisinina destruye específicamente a la población 4M5.3FR+ en un cultivo de linfocitos T humanos mixtos. El número absoluto de células 4M5.3FR+ disminuye a medida que aumenta la

concentración de FITC-Tub, mientras que las células 4M5.3FR- también se destruyen a través de los fármacos liberados y el efecto que resulta de estos a altas concentraciones.

5 La Figura 19 FITC-DM4 destruye específicamente a la población 4M5.3FR+ en un cultivo de linfocitos T humanos mixtos. El número absoluto de células 4M5.3FR+ disminuye a medida que aumenta la concentración de FITC-DM4, mientras que las células 4M5.3FR- también se destruyen a través de los fármacos liberados y el efecto que resulta de estos a altas concentraciones.

10 Figura 20. Dasatinib (inhibidor de Lck) e ibrutinib (inhibidor de ITK) a una concentración de 10 nM disminuyen el efecto de lisis de las células CAR T antiCD19 (CAR T FMC63, efector) contra las células tumorales Raji CD19+ (diana). Se han probado dos relaciones efector:diana (E:T). Los linfocitos T normales y CAR T antiCD19 con células K562 CD19- se usaron como control negativo.

15 Figura 21. FITC-dasatinib puede disminuir el efecto de lisis de células FMC63+4M5.3FR+hT hacia la célula Raji. Esto implica la internalización y liberación exitosa de FITC-dasatinib dentro de linfocitos T a través del receptor de fusión 4M5.3FR y la liberación de dasatinib en linfocitos T.

20 Figura 22. El inhibidor de TC-PTP a una concentración de 100 nM disminuye la población de moléculas coinhibidoras en células CAR T antiCD19 agotadas (generadas por 7 veces de estimulación con células Raji CD19+, ver procedimiento detallado más abajo). Tanto la población de PD-1, LAG3 como la doble positiva disminuyen tras el tratamiento. Esto implica que los inhibidores de fosfatasa, como el inhibidor de TC-PTP, pueden usarse como carga útil para la plataforma de puerta de enlace secreta para rejuvenecer la célula CAR T agotada.

25 TABLA 1. Aplicaciones potenciales de la plataforma de terapia celular FKBP-FRa y la carga útil correspondiente.

Listados de secuencias

30 SEQ ID NO:1 Secuencia de aminoácidos para FKBP-FRa de ratón

SEQ ID NO:2 Secuencia de aminoácidos para FKBP-FRa humano

35 SEQ ID NO:3 Secuencia de aminoácidos para constructo de CAR T antiCD19 de ratón

SEQ ID NO:4 Secuencia de aminoácidos para constructo de CAR T antiCD19 humano

SEQ ID NO:5 vector pWPI para transducción de linfocitos T humanos

40 SEQ ID NO:6 pMP71 gb NotIEcoRI antiCD19 de ratón para la transducción de linfocitos T de ratón

SEQ ID NO:7 pWPI-FRa 1-24 FKBP FRa

45 SEQ ID NO:8 pWPI mFKBP-mFRa SGGGS

SEQ ID NO:9 pHr EcorI hAnti cd19 1D3 myc bisagra cd28 cd3zeta

SEQ ID NO:10 pWPI pmei mAnti cd19 1D3 myc bisagra cd28 cd3zeta

50 SEQ ID NO:11 FKBP-1SG-FR con secuencia de aminoácidos de anclaje a GPI

SEQ ID NO:12 FKBP-3SG-FR con secuencia de aminoácidos de anclaje a GPI

55 SEQ ID NO:13 4M5.3-FR con secuencia de aminoácidos de anclaje a GPI

SEQ ID NO:14 FMC63-T2A-FKBP3SGFR

SEQ ID NO:15 FMC63-T2A-4M5.3SGFR

60 SEQ ID NO:16 FRb con péptido señal

SEQ ID NO:17 uPAR con péptido señal

SEQ ID NO:18 DHFR

65 SEQ ID NO:19 scFv contra FITC: 4M5.3(Kd = 200 pM)

SEQ ID NO:20 scFv contra FITC 4D5Flu (Kd=10 nM)

SEQ ID NO:21 scFv contra DNP SPE7

5 Descripción detallada

A menos que se defina de cualquier otra manera, las nomenclaturas científicas y tecnológicas tienen el mismo significado a como lo entiende comúnmente un experto en la técnica ordinaria relacionada con esta descripción.

10 Esta descripción proporciona una plataforma novedosa para controlar la actividad de las células trasplantadas mediante la incorporación genética de un receptor de fusión en la superficie celular trasplantada. Estas células trasplantadas se dirigirán específicamente mediante una carga útil de fármaco conjugado con ligando de molécula pequeña, mediante el uso de la alta afinidad intrínseca entre el ligando de molécula pequeña y el receptor de fusión en la superficie celular trasplantada. Una parte del receptor de fusión es responsable de internalizar el conjugado y la carga útil se liberará a través de un enlazador liberable una vez que esté dentro de las células trasplantadas. En dependencia del tipo de células trasplantadas y la regulación que se desea imponer a las células trasplantadas, la carga útil del fármaco puede ser de varias funciones. Al cambiar la carga útil en el conjugado, por ejemplo, como fármaco citotóxico o inhibidores de la cinasa, la carga útil del fármaco puede usarse para controlar los múltiples aspectos de las células trasplantadas, tales como la proliferación, la diferenciación o el perfil de liberación de citocinas.

15
20
25
30 La familia de isomerasa de peptidil-prolina (PPIasas) consiste de proteína de unión a FK506 (FKBP), ciclofilinas y parvulinas. En humanos, hay 18 FKBP, 24 ciclofilinas y 3 parvulinas. Entre estos, FKBP51 y FKBP52 comparten una afinidad de unión de alta a moderada de FK506, $KD^{FK506} \approx 104$ nM y $KD^{FK506} \approx 23$ nM, respectivamente, en comparación con FKBP12 ($KD^{FK506} \approx 0,2$ nM). Adicionalmente, ninguno de estos dos FKBP se expresa en la membrana celular, lo que da como resultado poca actividad de unión cruzada en nuestro sistema. También se han hecho esfuerzos para diseñar ligandos sintéticos que tengan mayor afinidad por FKBP12^{F36V} que por FKBP^{WT}, así como también a FKBP51^{F67V}, que preservan la estructura general de las proteínas de tipo salvaje. Todas las proteínas homólogas y mutadas junto con sus ligandos mencionados anteriormente, pueden adaptarse a esta descripción.

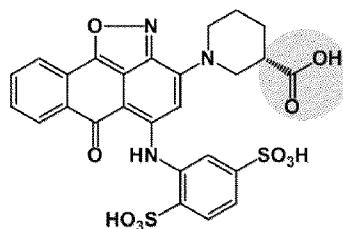
35 Particularmente, en una modalidad, se elige un par exemplificado de ligando de molécula pequeña y receptor de fusión como FK506-FKBP. Todo el proceso puede generalizarse en la Figura 1A, donde la carga útil de FK-506 se une primero a la célula modificada genéticamente FKBP-FRa; tras esta unión, la proteína de fusión transmembrana internalizará el enlazador de carga útil-FK506. A continuación, la carga útil de FK506 internalizada se escinde en el enlazador y la carga útil se libera en la célula. En dependencia del tipo de célula y el tipo de carga útil, el fármaco de carga útil liberado puede ejercer su función deseada.

40 En la Figura 1B, se ilustra una terapia celular mediada por linfocitos T con receptor de antígeno químérico específico. En este modelo, una célula CAR T que expresa una proteína de fusión con la estructura del extremo N terminal al extremo C terminal que comprende un péptido señal adecuado, un módulo de proteína 2 unido a un módulo de proteína 1 de ancla GPI se presenta a una célula cancerosa. En algunas modalidades, la célula cancerosa tiene proteína de superficie CD19, que será reconocida por la célula CAR T y se unirá con la carga útil asociada con la célula CAR T, cuando un ligando de direccionamiento se une a al menos un módulo del receptor de fusión. Típicamente, con la alta afinidad del ligando de direccionamiento hacia uno cualquiera de estos módulos, la carga útil asociada con el ligando puede internalizarse en la célula diana y liberarse para acoplarse a la célula cancerosa a través del receptor de antígeno químérico.

50 Pueden haber muchas combinaciones diferentes de proteínas ancladas a GPI, representadas como Módulo 1 y sus ligandos, y proteína de superficie celular diana del Módulo 2 y sus ligandos respectivos, representados en la Figura 2B. Se contempla que tanto la proteína del módulo 1 como la proteína del módulo 2, o ambas, pueden acoplar un ligando de direccionamiento de alta afinidad para facilitar el suministro de carga útil conjugada con el ligando. Por ejemplo, es factible tener una proteína de fusión que comprende la estructura FRa-enlazador-FKBP, en donde FRa se acopla con un derivado de FA, al mismo tiempo, FKBP se acopla a un derivado de FK506, ya sea un derivado de FA o un derivado de FK 506 o ambos pueden enlazarse a una carga útil, tal como un fármaco citotóxico, o un agente de obtención de imágenes, o un modulador. Con tal flexibilidad de transportar la misma o diferente carga útil, se puede lograr algún efecto de sinergia o regulatorio inesperado de la carga útil diferente o igual, o para observar la célula diana si la carga útil es un agente de obtención de imágenes. Las ventajas de la flexibilidad y la diversidad del suministro de carga útil de este sistema se apreciarán con más ejemplos.

60 De manera similar, otra modalidad de ligando emparejado con una proteína anclada a GPI puede ser

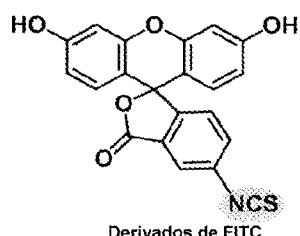
5



10 emparejado con uPAR.

También se contempla que FITC o sus derivados pueden unirse a un fragmento variable de cadena simple (scFv) de un anticuerpo contra FITC, por ejemplo, una estructura de ligando de

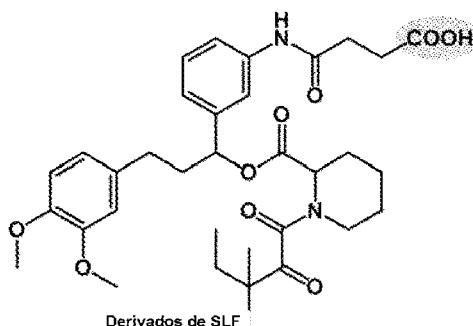
15



20

25 o una estructura de

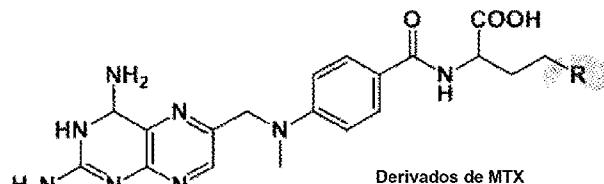
30



40

emparejado con FKBP, o

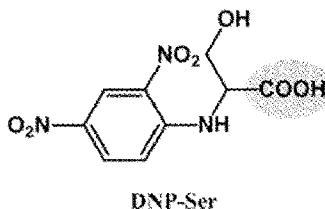
50



55

emparejado con DHFR, o

60



emparejado con scFv contra DNP.

65

Vale la pena mencionar algunas ventajas de elegir FK506-FKBP como una pareja de ligando-proteína ilustrativa en este sistema de suministro. 1. FKBP no es una proteína de membrana que se presente de forma natural en la membrana celular de mamíferos, de modo que el conjugado de carga útil FK506 se unirá específicamente a

la célula diana; 2. La proteína FKBP es una proteína relativamente pequeña con un peso molecular de 12 kDa, lo que hace más fácil su fusión con otros receptores con perturbación mínima a la estructura y propiedades de internalización de los receptores. 3. FK506 no está presente de forma natural dentro del ser humano, por lo que el receptor de fusión no se bloqueará; 4. La afinidad de unión entre FK506-FKBP es de alrededor de 4 pM de manera que el fármaco de carga útil puede suministrarse con alta afinidad; 5. La estructura de cocristal de FK506-FKBP está disponible y el sitio derivado bien establecido de FK506 conserva la unión de FK506-FKBP al tiempo que suprime la unión no deseada entre FK506 y calcineurina (ver Figura 2A).

Se contempla que la secuencia de FKBP puede modificarse, y el ligando de FK506 correspondiente puede modificarse en consecuencia en la medida en que las versiones modificadas de FKBP y la versión modificada de FK506 aún tengan la afinidad deseada como se ejemplifica en la presente descripción o mejor que la descripción actual.

Para la otra porción de la proteína de fusión, el receptor de folato (FR) se elige por su proceso de internalización bien entendido como un monómero. Investigaciones anteriores muestran que el conjugado de ácido de folato unido a 'carbonato mágico' puede internalizarse a través de FR y escindirse por el ambiente reductor dentro de la célula. Mediante el uso de este mecanismo, la carga útil del fármaco conjugado con FK506-FKBP se internaliza por FR y después se liberará al citoplasma.

Debido al gran potencial de la terapia CAR T, así como también a los efectos secundarios graves, se han informado varios diseños de células CAR T controlados. La mayoría de ellos se centraron en el interruptor ON/OFF mediante la incorporación de una compuerta booleana o una vía de cascada para la activación de linfocitos T (ver Figura 3, izquierda, que representa la regulación negativa y positiva de la actividad de células CAR T, adaptada de The quest for spatio-temporal control of CAR T cells, Sun J. etc. 2015). El grupo de Malcolm K.B. diseñó la proteína de fusión FKBP-caspasa9 y usó el dímero de FK506 para inducir la apoptosis de la célula diana (ver Figura 3, derecha, que representa el mecanismo de apoptosis mediada por FKBP-caspasa9 inducida por AP1903 (dímero de FK506) y la estructura de AP1903, adaptada de Inducible Apoptosis as a Safety Switch for Adoptive Cell Therapy, Malcolm K.B. etc. 2011).

La presente descripción tiene varias ventajas sobre estos métodos informados: 1. En lugar de un interruptor ON/OFF binario, nuestra plataforma puede suministrar múltiples tipos de cargas útiles reguladoras, modificando muchos aspectos de las células diana, por lo tanto tiene una gran flexibilidad en comparación con el interruptor ON/OFF binario; 2. el resto de control, FK506-carga útil, es una molécula pequeña, lo que hace posible el control lineal y la optimización de la dosificación en comparación con las células que se modificaron previamente. 3. La plataforma puede usarse no solo en células CAR T, sino también en muchas otras terapias regenerativas basadas en células madre.

La mayor novedad y la parte más importante de esta plataforma son las cargas útiles multifuncionales, que pueden seleccionarse para abordar los posibles efectos secundarios o mejorar la eficiencia de la terapia celular. Por ejemplo, los fármacos citotóxicos pueden suministrarse a las células trasplantadas si: 1. las células sobreproliferan y afectan al órgano o sistema normal, como la célula CAR T anti CD19. 2. Las células se vuelven tumorigénicas, lo que radica en la modificación génica basada en lentivirus y la característica intrínseca de las células madre.

Por otro lado, algunas terapias celulares tienen menos éxito debido al microambiente supresor del tejido diana. Por ejemplo, en la terapia con células CAR T contra tumores sólidos, además de la baja velocidad de penetración, la proliferación y activación de las células CAR T se suprime en gran medida por las MDSC y las células tumorales. Esto puede aliviarse potencialmente por la activación de linfocitos T inducidos por el agonista de ROR α o el inhibidor de la MAP cinasa, así como también por la expresión inducida por el agonista de TLR8 de granzima B en células CAR T. Aunque las dianas intracelulares, como ROR α , pueden ser más adecuadas para nuestra carga útil, los receptores de membrana tales como TLR8 también pueden ser accesibles debido a la proximidad en la membrana celular.

En la terapia regenerativa con células madre, la carga útil es más diversa de acuerdo con los modelos de enfermedades. En lugar de suministrar un gen predefinido, que se ha desarrollado mediante el uso de células madre como una plataforma de suministro de genes, la descripción actual proporciona un ajuste fino a las células trasplantadas y su microambiente, y obtiene el fenotipo deseado a través de diversas cargas útiles de moléculas pequeñas. Dado que la molécula pequeña se conjuga con FK506, que se dirige específicamente a la célula de trasplante de FKBP-FRa sobreexpresada, también se evita el direccionamiento no específico de tejidos normales de la molécula pequeña.

Uno de los muchos ejemplos es inducir la sobreexpresión de BMP2 en células madre mesenquimatosas (MSC) para la reparación de fracturas óseas en la terapia regenerativa esquelética. Mientras tanto, el nivel de expresión de BMP2 y/o VEGF puede aumentarse mediante la introducción de un inhibidor de GSK3 beta a las células trasplantadas a través de este sistema de suministro de carga útil de fármaco. El inhibidor de GSK3 beta es un fármaco conveniente para la reparación de fracturas óseas. Por lo tanto, los inhibidores de GSK3

beta son ideales como carga útil potencial para modular además la función de las MSC trasplantadas así como también el microambiente dentro de los sitios de fractura ósea.

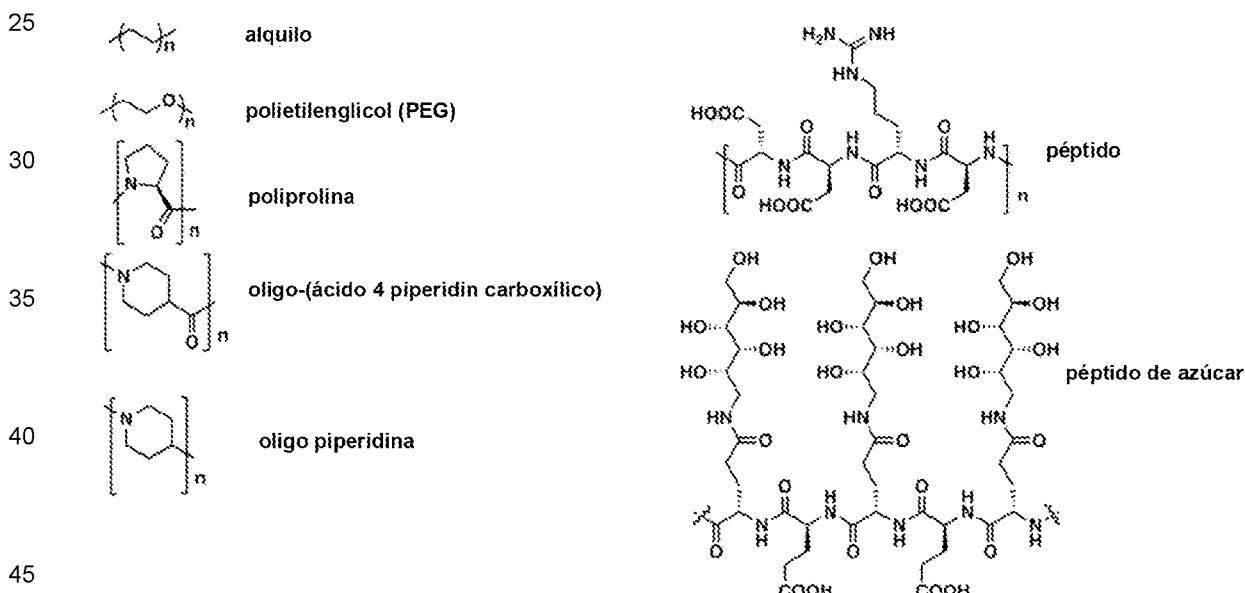
Otro ejemplo de este sistema de suministro de carga útil de fármacos se refiere a la enfermedad neurodegenerativa, que incluye la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, etc., donde la terapia basada en MSC tiene un futuro prometedor. Las MSC se han modificado para sobreexpresar GDNF, VEGF y muchas otras citocinas para promover la regeneración neuronal. Mientras tanto, se ha confirmado que las moléculas pequeñas como los inhibidores de MAO-B aumentan la expresión de GDNF, NGF y BDNF en astrocitos. También se han propuesto varios inhibidores de cinasas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, tales como el inhibidor de PI3K (BEZ235), el inhibidor de Cdk5 (roscovitina) y el inhibidor de GSK3b (NP-12). El uso del par FK506-FKBP para el suministro específico dirigido de estas moléculas pequeñas a las MSC en modelos neurodegenerativos mejorará la eficacia de la regeneración al tiempo que evita los efectos secundarios de estos potentes inhibidores y agonistas en otros tejidos no diana.

15 Materiales y métodos:

Compuestos y procedimiento de síntesis:

El ligando de direccionamiento se une con la carga útil a través de enlazadores. Las opciones de optimización del enlazador se enumeran más abajo. Las cargas útiles se caracterizan en 3 clases: I obtención de imágenes, II fármaco citotóxico, III fármaco regulador de molécula pequeña.

Optimización del enlazador:

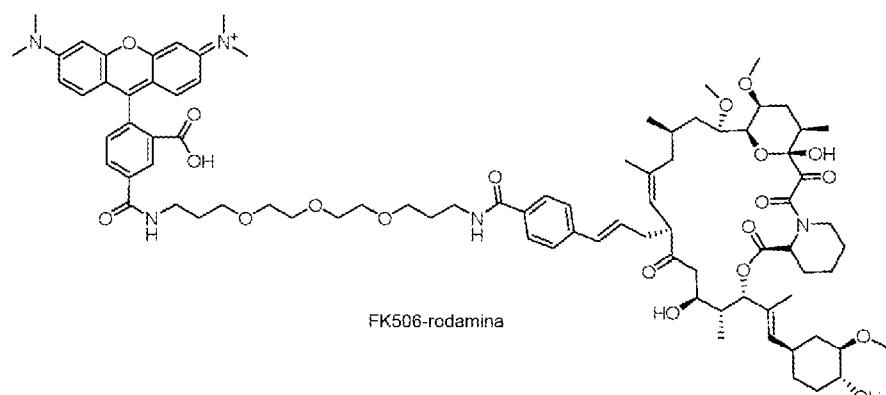


Clasificación de compuestos:

50	Clase	función	ejemplo
	I	Obtención de imágenes	Colorante fluorescente: Rodamina, obtención de imágenes de radioisótopo FITC; Cabeza quelante EC20, NOTA, DOTA
55	II	Fármaco citotóxico	Fármaco antimicrotúbulos: Tubulicina, DM1, DM4
	III	Modulador	Inhibidor de cinasa: Dasatinib, MEK1/2i, PI3Ki ARNip: mi181a1

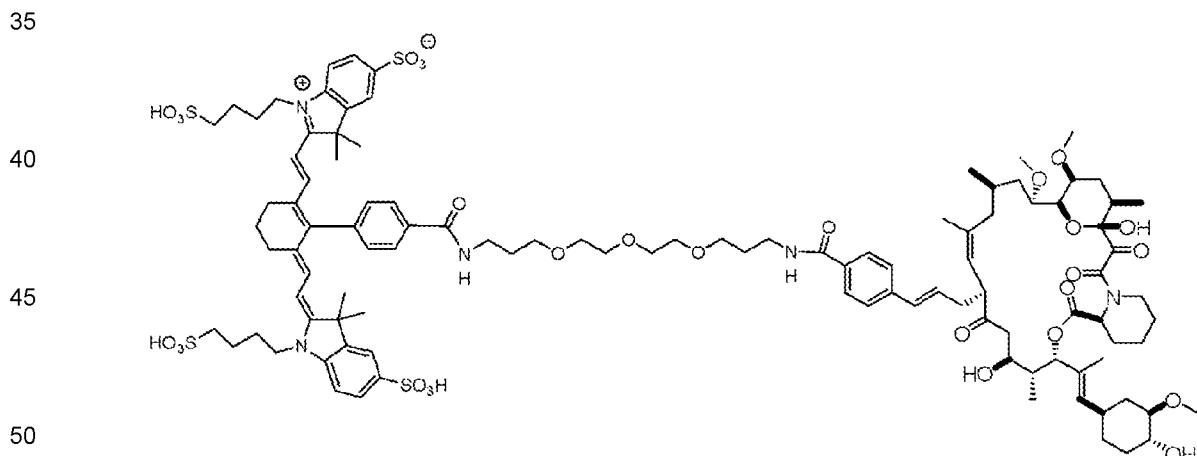
Estructura del compuesto detallada y ruta de síntesis

60 FK506-rodamina:



Procedimiento: El éster de rodamina-NHS (1,0 equiv.) en dimetilformamida se hizo reaccionar con Boc-NH-PEG₃-NH₂ (1,2 equiv.) y diisopropiletilamina (3,0 equiv.) durante 2 h a temperatura ambiente. El producto se purificó por HPLC preparativa de fase inversa con un detector UV. El conjugado rodamina-PEG₃-NH-Boc purificado (1,0 equiv.) se sometió a desprotección de Boc mediante agitación en un sistema de TFA-diclorometano 1:10 durante 2 h. El producto de amina libre crudo se disolvió después en dimetilformamida y se activó con EDC (2,0 equiv.), HOBT (2,0 equiv.) en presencia de diisopropiletilamina (3,0 equiv.). Después de 15 minutos, se añadió FK506-CO₂H (1,2 equiv., sintetizado mediante el uso del procedimiento en la referencia: Bioorg. Med. Chem., 17 (2009) 5763-5768) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. El conjugado de FK506-rodamina final se aisló después de la purificación en HPLC preparativa de fase inversa con un detector de UV (monitoreado a una longitud de onda de 280 nm). El producto crudo se cargó en una columna de HPLC preparativa Xterra RP18 (Waters) y se eluyó con condiciones de gradiente que iniciaron con fosfato de sodio al 95 % 5 mM (fase móvil A, pH 7,4) y acetonitrilo al 5 % (fase móvil B) y alcanzó 0 % de A y 50 % de B en 35 min a un régimen de flujo de 12 ml/min. Tiempo de retención del pico del producto = 2,5 min durante el gradiente (0-50 % B) en un análisis de HPLC-MS analítico de 7 min. ESI m/z = 1539,6. Abreviaturas: PEG = polietilenglicol; EDC = 1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; HOBT = hidroxibenzotriazol; HPLC = chromatografía líquida de alto rendimiento.

Colorante FK506-NIR:

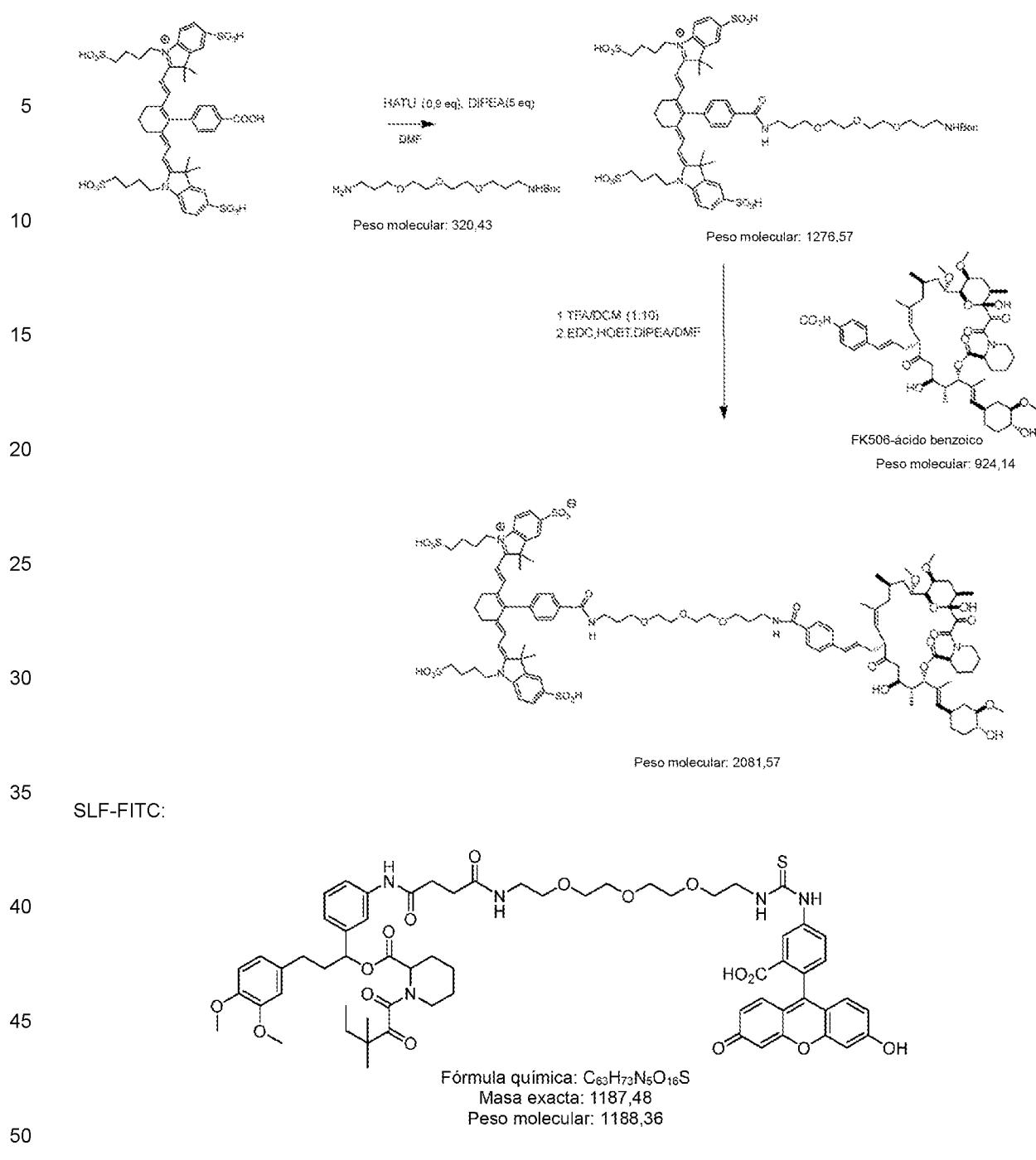


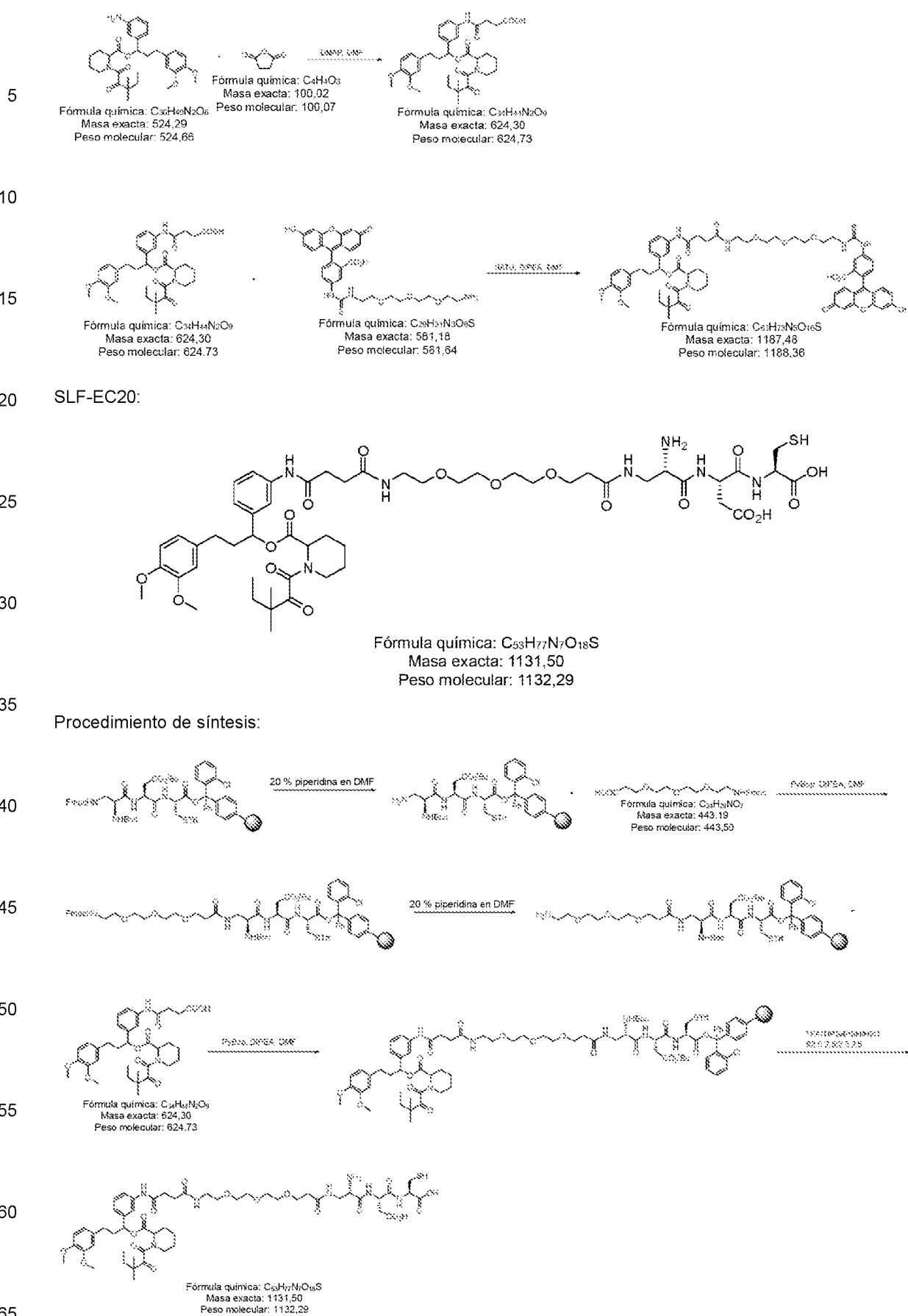
Peso molecular: 2081,57

55 Procedimiento de síntesis:

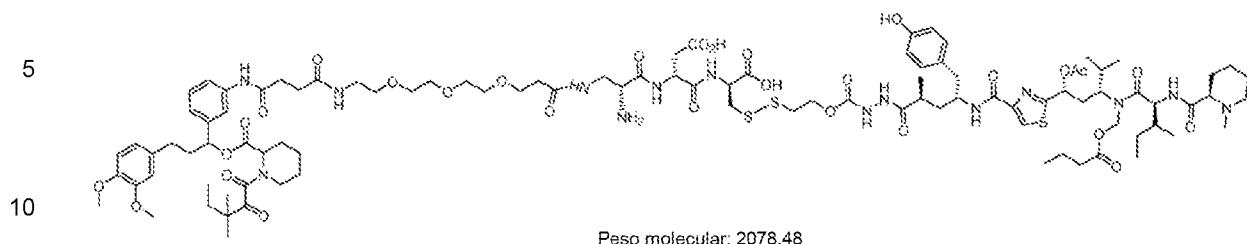
60

65

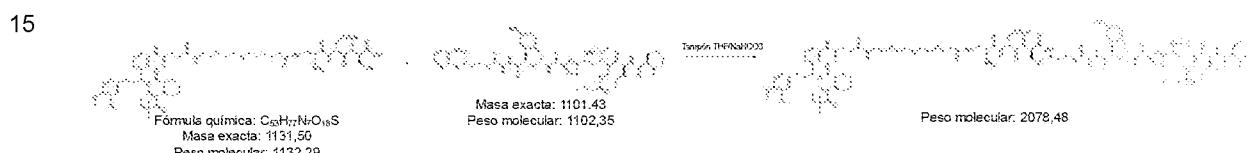




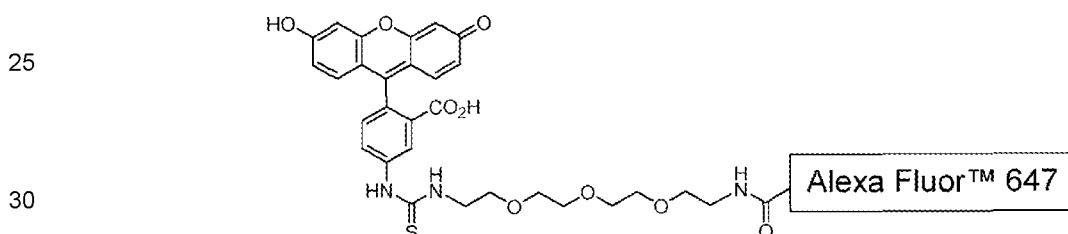
SLF-tubulisina:



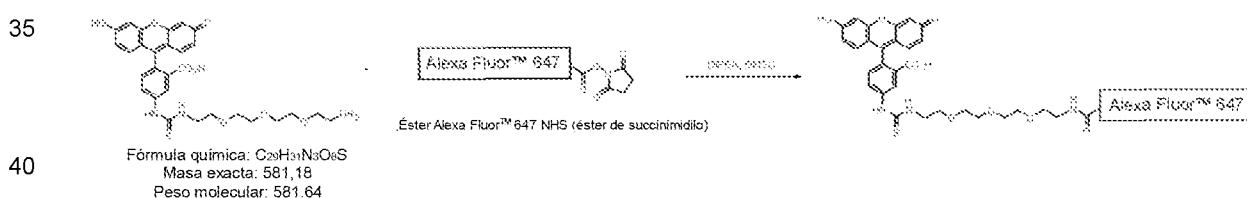
Procedimiento de síntesis:



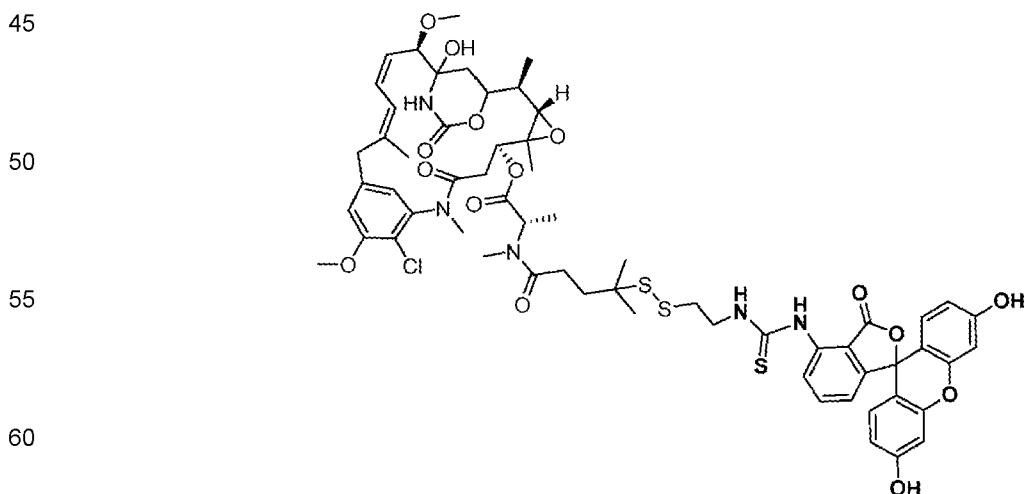
FITC-AF647:



Procedimiento de síntesis:

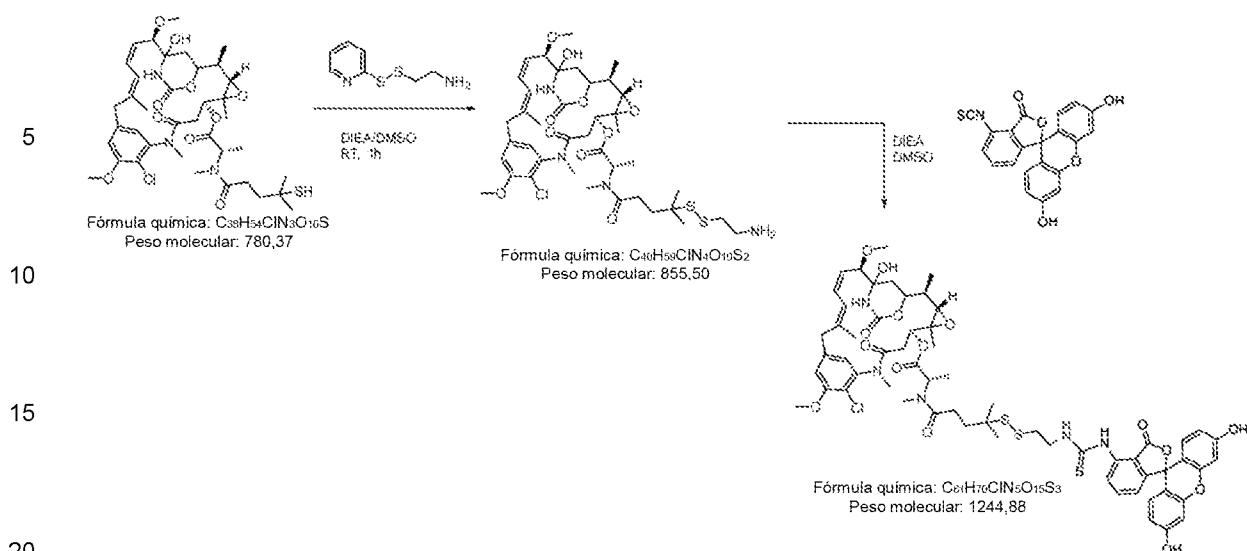


FITC-DM4:



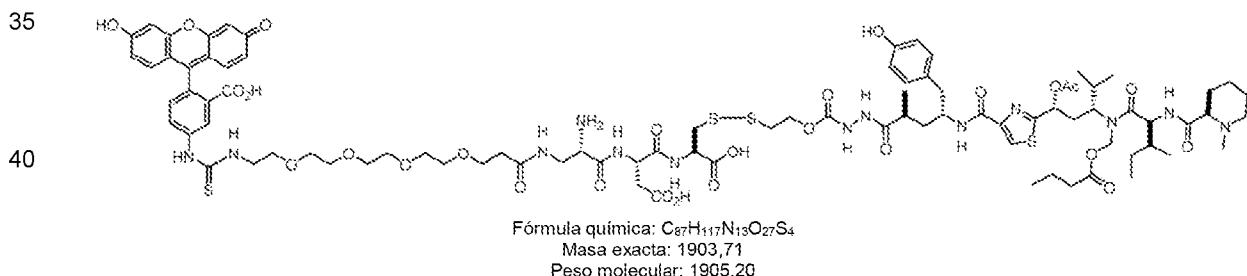
Procedimiento de síntesis:

65

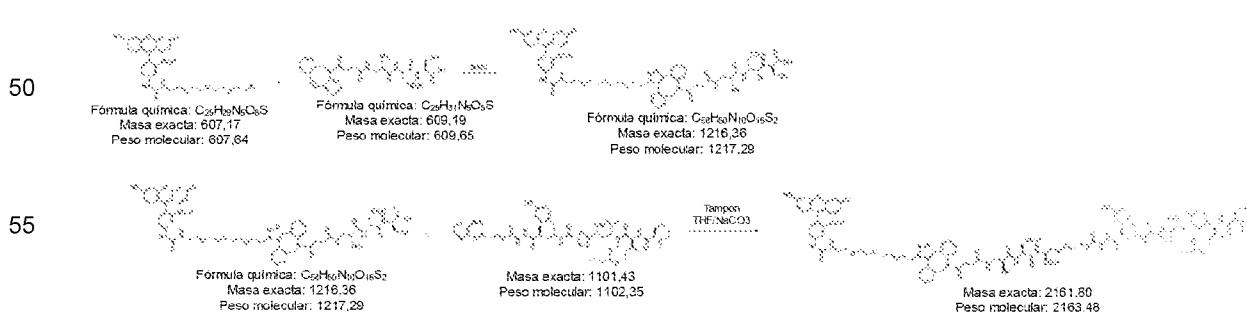


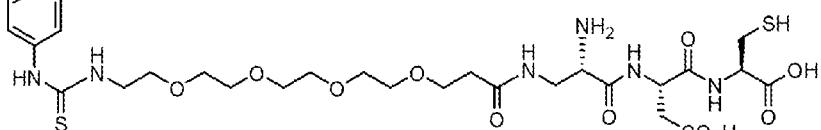
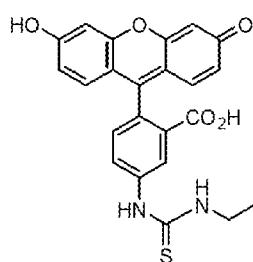
Procedimiento: Se hizo reaccionar DM4 (1,0 equiv.) en dimetilsulfóxido con 2-(piridin-2-ylsulfanyl)ethan-1-amina (1,0 equiv.) y diisopropiletilamina (3,0 equiv.) durante 1 h a temperatura ambiente. El producto crudo resultante se hizo reaccionar después con FITC (1,0 equiv.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h. El conjugado de FITC-DM4 final se aisló después de la purificación en HPLC preparativa de fase inversa con un detector de UV (monitoreado a una longitud de onda de 280 nm). El producto crudo se cargó en una columna de HPLC preparativa Xterra RP18 (Waters) y se eluyó con condiciones de gradiente que iniciaron con fosfato de sodio al 95 % 5 mM (fase móvil A, pH 7,4) y acetonitrilo al 5 % (fase móvil B) y alcanzó 0 % de A y 100 % de B en 10 min a un régimen de flujo de 12 ml/min. Tiempo de retención del pico del producto = 4,23 min durante el gradiente (0-100 % B) en un análisis de HPLC-MS analítico de 7 min. ESI m/z = 1244,8. Abreviaturas: FITC = isiotiocianato de fluoresceína; HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento.

FITC-Tub



45 Procedimiento de síntesis:

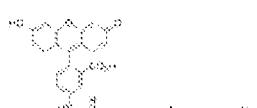
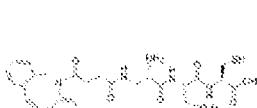


Fórmula química: C₄₂H₅₀N₆O₁₆S₂

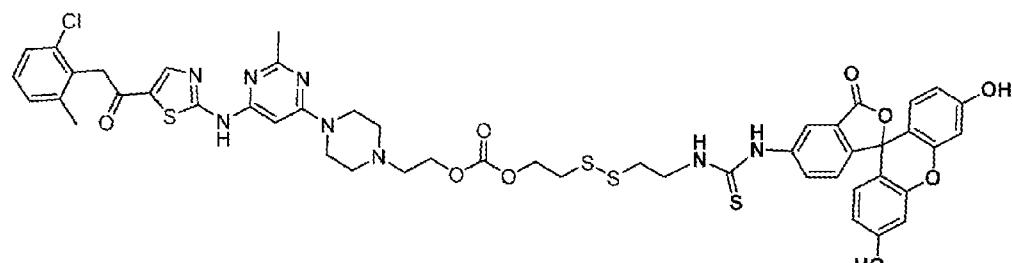
Masa exacta: 958,27

Peso molecular: 959,01

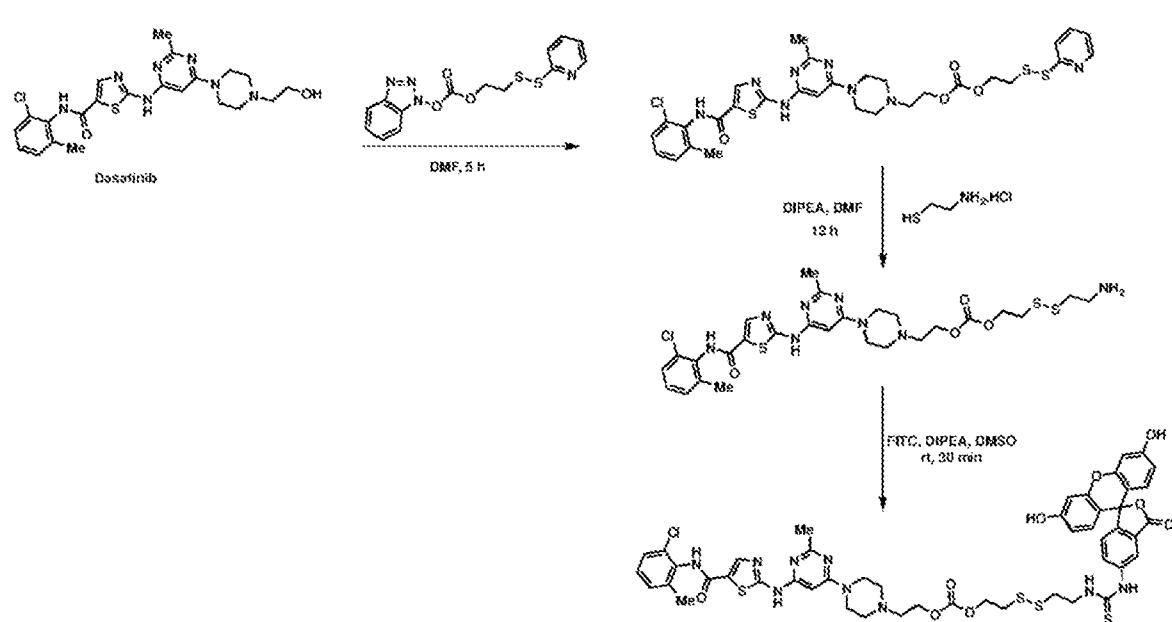
15 Procedimiento de síntesis:

Fórmula química: C₂₀H₂₂N₂O₈S
Masa exacta: 607,17
Peso molecular: 607,64Fórmula química: C₂₀H₂₃N₂O₈S
Masa exacta: 609,19
Peso molecular: 609,65Fórmula química: C₂₀H₂₄N₂O₈S₂
Masa exacta: 1216,36
Peso molecular: 1217,29

25 FITC-dasatinib



40 Procedimiento de síntesis:



El procedimiento del experimento:

Cultivo celular

Las células 293TN se cultivaron en DMEM con FBS al 10 %, sin antibiótico para el empaquetamiento del lentivirus. Las células Raji y Jurkat se cultivaron en RPMI-1640 con FBS al 10 %, penicilina/estreptomicina al 10 %. Los linfocitos T humanos primarios se aislaron de hPBMC mediante el uso de ficoll, se enriquecieron mediante selección negativa con EasySep™ Kit de enriquecimiento de linfocitos T humanos (19051, Stemcell Tech), activado por Dynabeads CD3/CD28 (11161D, Thermo Fisher) durante 1 día, cultivado con medio TexMACS complementado con 30 IU de hIL2 (130-097-745, Miltenyi Biotec Inc.). Los linfocitos T se crioconservaron en RPMI-1640 con suero AB humano al 20 % (HP1022, Valley Biomedical) y DMSO al 10 %.

Empaque de lentivirus

El lentivirus pseudotipado VSV-G pantrópico se produjo mediante la transfección de células 293TN con el vector de expresión del transgén y la mezcla de plásmido de empaquetamiento (CPCP-K2A, Collecta) mediante el uso de Lipofectamina 2000. A las 24 h, se cosechó el sobrenadante viral, se concentró y después se añadió a ciertas líneas celulares o a los linfocitos T primarios que se descongelaron el mismo día. Para la transducción de linfocitos T, las células se centrifugaron a 2500 rpm durante 90 minutos, 37 grados después de añadir el sobrenadante del virus y 8 ug/ml de polibreno.

Ensayo de unión

Para el ensayo de unión, las células se incubaron con el colorante-ligando solo o con el colorante-ligando y ligandos libres (100x, preincubadas durante 30 min) durante 30 min, a 4 grados. Las células se lavaron 3 veces después de la incubación y se resuspendieron en PBS con FBS al 2 %, se añadió 7-AAD para seleccionar las células muertas. Obtención de imágenes FRET de FK506-rodamina y FA-S0456: Para comprender la ocupación del receptor de fusión, las células Jurkat FKBP-FRa+ se incubaron con FA/FA-S0456, FK506/FK506-rodamina en la secuencia y concentración indicadas. La FRET se visualiza mediante la pérdida de intensidad de FA-rodamina a medida que su energía se transfiere a FA-OTL38 en el mismo receptor o cercano, detectado mediante el citómetro de flujo BD Fortessa. Los resultados se analizaron mediante el uso del software FlowJo.

Tratamiento con PI-PLC para liberar la proteína anclada a GPI

Se incubaron 1×10^5 células con 5 mU o 50 mU de PI-PLC (P5542-5UN, Sigma) en tampón de digestión (BSA al 2 %) a 37 grados durante 30 min; después de la incubación, las células se lavaron tres veces con PBS y después se incubaron con el ligando-colorante durante 30 min en hielo.

Ensayo de viabilidad celular

Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos y se incubaron con diferentes concentraciones de ciertos ligando-fármaco citotóxico durante 2 h, con o sin preincubación 100x de la competencia del ligando libre. Después de 2 h de incubación, las células se lavaron con medio tibio 3 veces y se repusieron con medio fresco. Después de 72 h, el número de células se probó mediante el ensayo CellTiter-Glo® (G7570, Promega) o se cuantificó mediante tinción de colorante-ligando de células positivas al receptor.

Efecto de lisis de células CAR T

Se coincubaron 1×10^5 células CAR T y un cierto número de células Raji en una placa de 96 pocillos, de acuerdo con la relación E:T, con o sin el fármaco de tratamiento. Después de 24 h, se extrajeron 100 μ l de sobrenadante para el ensayo de LDH. El porcentaje de lisis se calculó como (grupo de tratamiento - solo CAR T)/(lisis máxima - solo CAR T)%

Agotamiento de células CAR T

Se repitió la adición de 1×10^6 células Raji a 1×10^6 células CAR T en placas de 24 pocillos cada 12 h, sin cambiar el medio. El estado de agotamiento se caracterizó por un efecto de lisis más bajo y una expresión más alta de moléculas coinhididoras: PD-1, LAG-3 y Tim-3.

Ablación in vivo de las CAR T positivas al receptor de fusión por el fármaco ligando-citotóxico

Se inyectaron 4×10^5 células luc+Raji por vía i.v. en los ratones NSG. Después de 6 días, se inyectaron por vía i.v. 1×10^7 células CAR T positivas al receptor de fusión. El día 8, se inyectó por vía i.v. una vez, el fármaco ligando-citotóxico (0,5 umol/kg, 1 umol/kg). Se midieron IL2, INF γ mediante ELISA mediante el uso de muestras de suero tomadas cada 3 días después de la inyección de CAR T. Las células CAR T en sangre periférica se contaron mediante citometría de flujo.

Modulación in vivo de CAR T positivas a receptor de fusión por ligando-fármaco

5 Se inyectaron 4×10^5 células luc+Raji por vía i.v. en los ratones NSG. Después de 6 días, se inyectaron por vía i.v. 1×10^7 células CAR T positivas al receptor de fusión. El día 7, se inyectó por vía i.v. una vez el fármaco ligando-fármaco (0,5 umol/kg, 1 umol/kg). En el caso del modelo de agotamiento de CAR T, se inyectaron por vía i.v. 1×10^5 CAR T el día 6, una vez que la población de CAR T se mostró en sangre periférica y la carga tumoral no se estabilizó y continuó aumentando, se inyectaron por vía i.v. ligando-fármaco (0,5 umol/kg, 1 umol/kg).

Obtención de imágenes y seguimiento in vivo de CAR T positivas al receptor de fusión

10 10 Se inyectaron 2×10^6 Raji por vía subcutánea en el hombro derecho de ratones NSG. 14 días después, se inyectaron por vía i.v. 1×10^7 CAR T positivas para el receptor de fusión. El día 16, los animales recibieron conjugados unidos a $99mTc$ (10 nmol, 150 μ Ci) mediante inyección por vía i.v. y se obtuvieron imágenes mediante la máquina de obtención de imágenes SPECT.

15 **Ejemplos**

1. Diseño de proteína de fusión y su expresión

20 20 1.1. Diseño del receptor de fusión FKBP-FR (SEQ ID NO:2)

Síntesis de derivados de FK506: La síntesis de FK506-rodamina y FK506-tubulisina se describió en la sección de materiales y métodos.

25 25 hFRa es una proteína de membrana anclada a GPI, que tiene 24 aminoácidos en el extremo N terminal como un péptido señal. Para preservar la presentación y propiedad de internalización de la membrana, elegimos usar la longitud completa de FRa e incorporar la secuencia hFKBP, así como también un enlazador peptídico flexible (SGGGGS) entre T24 y R25 de hFRa (Figura 4a). El enlazador flexible se elige para que sea resistente a las digestiones enzimáticas comunes en el cuerpo humano. A continuación, toda la secuencia se inserta en un vector de expresión de lentivirus pWPI, con EF1a como el promotor deseado para la expresión de proteínas en 30 el linfocito T transducido.

1.2. Expresión del receptor de fusión FKBP-FR en células transducidas

35 35 La expresión de FKBP-FRa se confirma mediante transferencia de western en K562 transducido por lentivirus. La lisis de células K562 transducidas muestra una banda específica alrededor de 50 kDa en comparación con células no transducidas frente al anticuerpo hFRa (Figura 4b).

1.3. Construcción de la proteína de fusión de FKBPFR3GS (indicada como FF3)

40 40 Ver Figura 4d (SEQ ID NO:12). Desde el extremo N terminal al extremo C terminal tiene 1-24 aa de FRa humano como el péptido señal, proteína FKBP humana, tres enlazadores Gly-Ser y después 2-258 aa de FRa humano. En un diseño constructivo de FKBPFR1GS (indicado como FF1), los tres enlazadores Gly-Ser de FF3 se sustituyen con un enlazador Gly-Ser con otras partes sin cambios. Como se mostrará en los ensayos de unión, el aumento de la longitud del enlazador reduce la interferencia entre los dos componentes en la proteína de fusión.

1.4. Construcción de la proteína de fusión de FITC-svFv-FR con enlazador GS.

50 50 Ver Figura 4e. El constructo también se denomina 4M5.3 FR (SEQ ID NO:13). Desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, tiene un péptido señal hCD8, svFv de 4M5.3 (contra FITC), enlazador GS, 25-258 aa de FRa humana.

1.5. Seguimiento no invasivo in vivo de células positivas para FKBP-FRa/FKBPtFRa mediante obtención de imágenes PET de $99mTc$

55 55 Para el modelo de células CAR T, se implantaron por vía subcutánea 1×10^6 células KB en NSG (Jackson laboratory). Después de que el tumor alcanza los 100 mm^3 , se inyectan por vía intravenosa 15 millones de linfocitos T humanos anti-FITC CAR+ FKBP-FRa+ o anti-FITC CAR+ FKBP-FRa- a los ratones. FITC-FA se inyecta los días indicados para inducir la proliferación de CAR T. Se obtienen imágenes de los ratones cada dos días después de la implantación de CAR T mediante el siguiente procedimiento. El día de la obtención de imágenes, la cabeza de FK506-EC20 se formula con $99mTc$ de acuerdo con el informe anterior. Se inyectan por vía i.v. 200 uCi de $99mTc$ en 100 μ l de solución a cada ratón y MiLab PET/CT toma la imagen de todo el cuerpo, con enfoque en el área tumoral, el bazo y los ganglios linfáticos. Las imágenes 3D se reconstruyen mediante el software PMOD. Después de la última obtención de imágenes alrededor del día 10 después de la implantación de CAR T, los ratones se sacrifican y la distribución de $99mTc$ en cada órgano se cuenta mediante contador de gamma.

Para el modelo de trasplante de células madre hematopoyéticas, los ratones NSG humanizados se generan como se informó anteriormente. Se infunden por vía i.v. 10 millones de hHSC CD34+ FKBP-FRa+ en los ratones NSG humanizados. 4 meses después, se toma una imagen de todo el cuerpo mediante el uso de FK506-99mTc como se mencionó anteriormente, con enfoque en la médula ósea y la columna vertebral.

- 5 2. El receptor de fusión FKBP-FRa se une específicamente e internaliza la carga útil de FK506
- 10 2.1. El receptor de fusión FKBP-FRa se une específicamente a FK506-rodamina
- 15 2.2. Unión de FK506-rodamina por el receptor de fusión FKBP-FRa (obtención de imágenes de FRET de FK506-rodamina y FA-S0456)
- 20 Para comprender la ocupación del receptor de fusión, las células Jurkat FKBP-FRa+ se incubaron con FA/FA-S0456, FK506/FK506-rodamina en la secuencia y concentración indicadas. La FRET se visualiza mediante la pérdida de intensidad de FA-rodamina a medida que su energía se transfiere a FA-OTL38 en el mismo receptor o cercano, detectado mediante el citómetro de flujo BD Fortessa.
- 25 La Figura 5 muestra que la unión del ácido de folato en la proteína de fusión FKBPFR1GS bloquea la unión de FK506-rodamina a tan solo 0,01 nM y abolió totalmente la unión de FK506-rodamina a 50 nM.
- 30 La Figura 6 muestra que las células Jurkat FKBPFR1GS tienen una intensidad de FK506-rodamina disminuida después de unirse a OTL38, un colorante dirigido al receptor de folato. La FRET de FK506-rodamina (donante) a OTL38 (FA-S0456, aceptor, ex/em:774/794 nm) indica la interacción entre FR y FKBP dentro del receptor de fusión.
- 35 La Figura 7 muestra que aumentar la longitud del enlazador entre FKBP y FR reduce significativamente la interferencia entre los dos componentes de la proteína de fusión. En comparación con FF1 (1GS entre FKBP y FR), FF3 (3GS entre FKBP y FR) conserva la unión de FK506-rodamina en presencia de FA 10 nM, que es comparable a la concentración fisiológica de FA en el cuerpo humano.
- 40 2.3. Liberación de receptor de fusión FF3 anclado a GPI
- 45 Mediante el uso de PI-PLC, tratar linfocitos T que tienen proteína de fusión FF3 dio como resultado la liberación del receptor FF3 anclado a GPI. El linfocito T Jurkat con receptor de fusión FF3 muestra una unión saturada con FA-FITC 20 nM (EC17), mientras que después del tratamiento con 5 mU de PI-PLC o 50 mU de PI-PLC, el FA-FITC pierde la unión a la célula, lo que indica la liberación del receptor de fusión FF3 anclado a GPI. Ver la Figura 8.
- 50 2.4. La proteína de fusión FKBPFR3GS en linfocitos T humanos conserva la propiedad de unión a FR
- 55 La curva de unión FA-rodamina se muestra en el receptor de fusión FKBPFR3GS. El receptor de fusión FKBPFR3GS que se expresa de manera estable en linfocitos T humanos puede unirse al derivado de ácido de folato (FA-rodamina) con alta afinidad ($K_d=0,95$ nM), que es comparable a la afinidad de FA-rodamina en células KB FR+ (K_d alrededor de 1 nM). Por lo tanto, se conserva la propiedad de unión del FR en el receptor de fusión. Ver la Figura 9.
- 60 2.5. La proteína de fusión FKBPFR3GS en linfocitos T humanos conserva la propiedad de unión a FKBP
- 65 Curva de unión de FK506-rodamina en el receptor de fusión FKBPFR3GS. El receptor de fusión FKBPFR3GS que se expresa de manera estable en el linfocito T humano es capaz de unirse al derivado de FK506 (FK506-rodamina) con alta afinidad ($K_d=3,93$ nM), lo que significa que se conserva la propiedad de unión de FKBP en el receptor de fusión. Ver la Figura 10.
- 70 2.6. SLF-FITC se une al receptor de fusión FKBPFR3GS con afinidad de unión relativamente alta ($K_d=62$ nM)
- 75 La competencia del SLF libre (100, preincubación) bloquea la unión de SLF-FITC. SLF, un imitador de FK506, presenta una afinidad de unión 10 veces menor al receptor de fusión FKBPFR, en comparación con el ligando parental FK506. Ver Figura 11 y comparar con Figura 10.

2.7. Curva de unión de FA-rodamina en el receptor de fusión 4M5.3FR.

FA-rodamina puede unirse al receptor de fusión 4M5.3FR que se expresa de manera estable en linfocitos T humanos con alta afinidad ($K_d=2,25$ nM), que es comparable a la afinidad de FA-rodamina en células KB FR+ (Kd de alrededor de 1 nM). Por lo tanto, la propiedad de unión a FR se conserva en el receptor de fusión 4M5.3FR. Ver la Figura 12.

2.8. Curva de unión de FITC-AF647 en el receptor de fusión 4M5.3FR.

10 FITC-AF647 puede unirse al receptor de fusión 4M5.3FR que se expresa de manera estable en linfocitos T humanos con alta afinidad ($K_d=8,03$ nM). 100x comp indica FITC libre de sodio. La propiedad de unión del scFv 4M5.3 con FITC se conserva en el receptor de fusión 4M5.3FR. Ver la Figura 13.

3.1. Efecto de destrucción de FA-tubulisina contra linfocitos T humanos FF3+

15 FA-tubulisina es capaz de mediar un efecto de destrucción específico del receptor contra el linfocito T humano FF3+. La compensación con FA (100x preincubación con FA) bloquea el efecto. Esto implica la internalización y liberación exitosa del fármaco libre tubulisina a través del sistema de receptores de fusión FF3. Ver la Figura 14.

20 3.2. Efecto de destrucción de FA-tubulisina contra la población hFF3+ en un cultivo de linfocitos T humanos mixto.

25 FA-tubulisina destruye específicamente a la población hFF3+ en un cultivo de linfocitos T humanos mixtos. El porcentaje de células hFF3+ disminuye a medida que aumenta la concentración de FA-Tub. Ver la Figura 15.

3.3. SLF-Tub destruye específicamente las células Jurkat hFF3+ con una $IC_{50} = 138$ nM.

30 La incubación de 2 h de SLF-Tub con células Jurkat hFF3 es capaz de destruir las células positivas al receptor. Esto indica la internalización exitosa de SLF-Tub por el receptor de fusión FKBPFR3GS y la liberación de la tubulisina dentro de la célula. Ver la Figura 16.

3.4. Efectos de destrucción de FITC-DM4 y FITC-Tub contra linfocitos T humanos 4M5.3FR+

35 Tanto FITC-DM4 como FITC-Tub pueden destruir específicamente a los linfocitos T humanos 4M5.3FR+, mientras que FITC-Tub tiene una IC_{50} más alta. La compensación de FITC libre de sodio (100x preincubación) bloquea el efecto de destrucción mediado por receptores. Esto implica la internalización y liberación exitosa del fármaco citotóxico FITC en linfocitos T a través del receptor de fusión 4M5.3FR. Ver la Figura 17.

40 3.5. FITC-tubulisina destruye específicamente a la población 4M5.3FR+ en un cultivo de linfocitos T humanos mixtos.

45 El número absoluto células 4M5.3FR+ disminuye a medida que aumenta la concentración de FITC-Tub, mientras que las células 4M5.3FR- también se destruyen a través de los fármacos liberados y el efecto que resulta de estos a altas concentraciones. Ver la Figura 18.

3.6. FITC-DM4 destruye específicamente la población 4M5.3FR+ en un cultivo de linfocitos T humanos mixtos.

50 El número absoluto de células 4M5.3FR+ disminuye a medida que aumenta la concentración de FITC-DM4, mientras que las células 4M5.3FR- también se destruyen a través de los fármacos liberados y el efecto que resulta de estos a altas concentraciones. Ver la Figura 19.

3.7. Efecto de la modulación de inhibidores de cinasa sobre las células CAR T antiCD19 contra Raji CD19+

55 Dasatinib (inhibidor de Lck) e ibrutinib (inhibidor de ITK) a una concentración de 10 nM disminuyen el efecto de lisis de las células CAR T antiCD19 (CAR T FMC63, efector) contra las células tumorales Raji CD19+ (diana). Se han probado dos relaciones efector:diana (E:T). Los linfocitos T normales y CAR T antiCD19 con células K562 CD19- se usaron como control negativo. Ver la Figura 20.

60 3.8. FITC-dasatinib puede disminuir el efecto de lisis de las células FMC63+4MFR+hT hacia las células Raji.

Esto implica la internalización y liberación exitosa de FITC-dasatinib dentro de linfocitos T a través del receptor de fusión 4M5.3FR y la liberación de dasatinib en linfocitos T. Ver la Figura 21.

65 3.9. El inhibidor de TC-PTP a una concentración de 100 nM disminuye la población de moléculas coinhibidoras en células CAR T antiCD19 agotadas

Las células CAR T antiCD19 agotadas se generaron mediante 7 veces de estimulación con células Raji CD19+, ver procedimiento detallado en la sección de materiales y métodos). La población positiva para PD-1, positiva para LAG3 y doble positiva disminuye tras el tratamiento. Ver la Figura 22.

5 4. Otra carga útil de FK506 para controlar la actividad de la terapia celular

La característica técnica ventajosa de este sistema de suministro de carga útil de fármaco es tener multifuncionalidad. Las posibles cargas útiles y los efectos correspondientes se enumeran más abajo (Tabla 1). Las cargas útiles de moléculas pequeñas se seleccionan en base a los siguientes parámetros: 1. el ensayo de funcionalidad del fármaco libre, tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha confirmado mediante la literatura publicada o el trabajo en nuestro laboratorio. 2. La estructura química del fármaco tiene una amina libre relativamente más accesible para la derivatización. 3. Cualquiera de los siguientes será preferible: Medicamento probado por la FDA; disponible comercialmente a un precio razonable. La carga útil de FK506 se probará primero para los experimentos *in vitro*, la activación de linfocitos T y la liberación de citocinas de células madre se monitorearán mediante inmunoensayos multiplexados. Para los modelos de enfermedad *in vivo*, tenemos terapia CAR T y modelos de ratones con fractura ósea bien establecidos en nuestro laboratorio, y varios colaboradores potenciales para los modelos de ratones neurodegenerativos.

Modelo de enfermedad	Subtipo	Tipo célula	Origen célula	Tipo carga útil
Terapia células madre	Transplante de HSC	SMSC	BM murino	Inhibidor GSK3b
Tumor	Microambiente del tumor	CAR T	Célula hPBMC T	Inhibidor de GSK3b, inhibidor de HDAC, inhibidor de MAPK

25

30

35

40

45

50

55

60

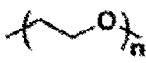
65

REIVINDICACIONES

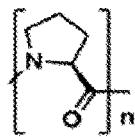
1. Una plataforma de suministro de fármacos para la terapia celular, que comprende:
 - a. una proteína manipulada genéticamente en una célula diana para trasplante, en donde la proteína manipulada genéticamente comprende un primer componente y un segundo componente, el primer componente y el segundo componente se conectan mediante un enlazador peptídico, el primer componente es una proteína que no es de membrana, el segundo componente es un péptido o proteína anclado a la membrana;
 - b. al menos un ligando pequeño conjugado a un enlazador, en donde el al menos un ligando pequeño tiene afinidad intrínseca alta por al menos un componente de la proteína manipulada genéticamente; y
 - c. al menos una carga útil del fármaco conjugado al enlazador, en donde la carga útil de fármaco se asocia con la célula diana cuando el ligando pequeño se une a al menos un componente de la proteína manipulada genéticamente.
2. La plataforma de suministro de fármacos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la carga útil de fármaco es un agente de obtención de imágenes, un fármaco citotóxico, un modulador de la expresión génica o un modulador de la actividad celular.
3. La plataforma de suministro de fármacos de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el agente de obtención de imágenes se selecciona del grupo que consiste en colorante fluorescente rodamina, fluoresceína, S0456, o en donde el agente de obtención de imágenes se selecciona del grupo que consiste en restos de obtención de imágenes quelantes de radioisótopos, cabeza quelante EC 20, NOTA y DOTA; el fármaco citotóxico se selecciona del grupo que consiste en tubulisina, DM1, DM4 y una auristatina; el modulador se selecciona del grupo que consiste en dasatinib, inhibidor de MEK1/2, inhibidor de PI3K; o en donde el modulador se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de HDAC, inhibidor de cinasa e inhibidor metabólico, opcionalmente en donde el modulador es un inhibidor beta de GSK3, un inhibidor de MAO-B, un inhibidor de Cdk5 o un agonista de ROR γ t; en donde opcionalmente el inhibidor de fosfatasa actúa contra SHP1/2 y TC-PTP.
4. La plataforma de suministro de fármacos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el enlazador para conectar el ligando pequeño y el fármaco de carga útil se selecciona del grupo que consiste en:



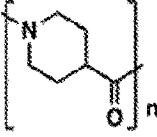
alquilo



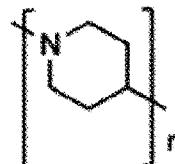
polietilenglicol (PEG)



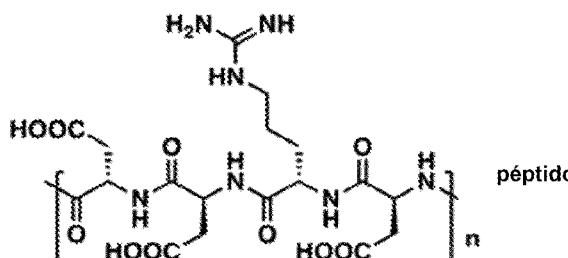
poliprolina



oligo-(ácido-4-piperidin carboxílico)



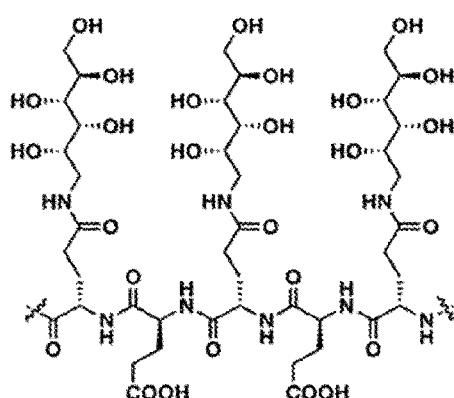
oligo piperidina



péptido

y

5



péptido de azúcar

10

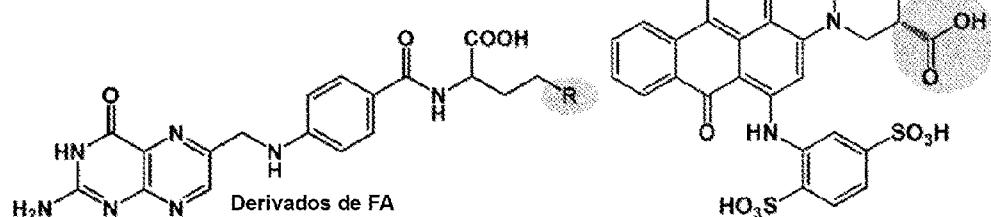
15

un enlazador liberable o sus combinaciones.

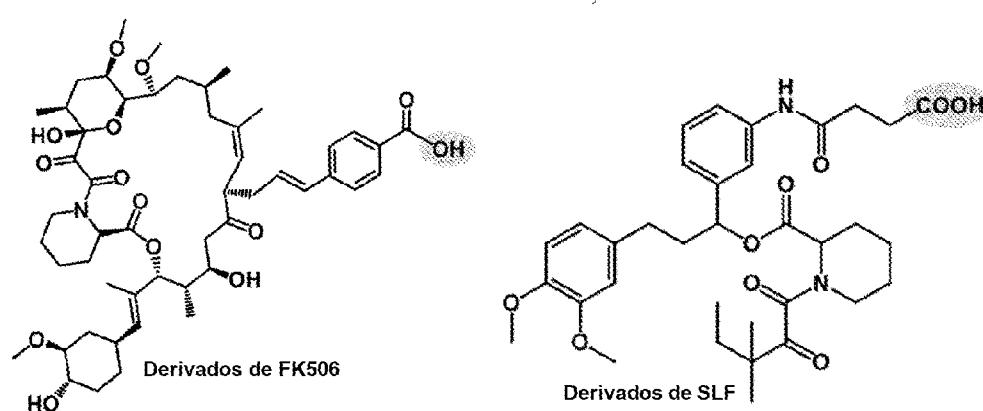
20

5. La plataforma de suministro de fármacos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los componentes proteicos manipulados genéticamente se seleccionan del grupo que consiste en el receptor de folato alfa (FR_a), receptor de folato beta (FR_b), receptor de uroquinasa (uPAR), proteína de unión a FK506 (FKBP), dihidrofolato reductasa (DHFR), fragmento variable de cadena simple contra isoftiocianato de fluoresceína (scFv contra FITC), y fragmento variable de cadena simple contra dinitrofenol (scFv contra DNP).
25. 6. La plataforma de suministro de fármacos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ligando pequeño se selecciona del grupo que consiste en:

30



35



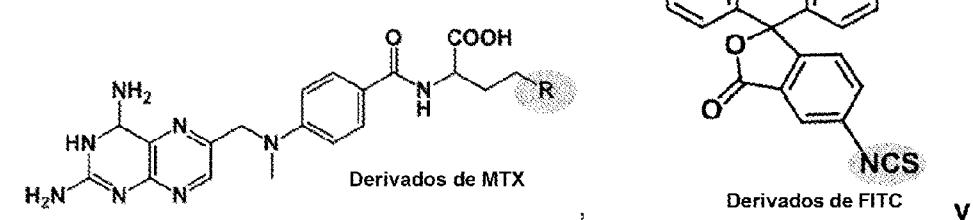
40

45

50

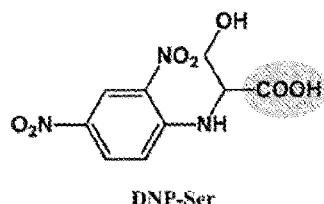
55

60



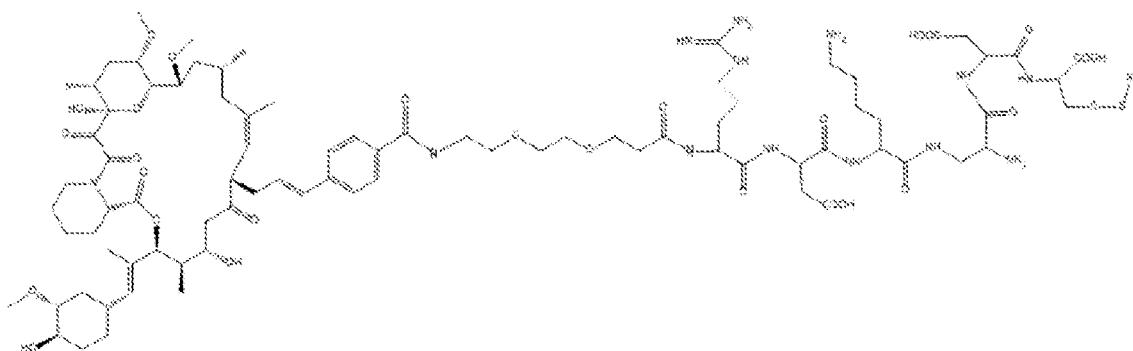
65

5



- 10 7. La plataforma de suministro de fármacos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primer componente es FKBP, el segundo componente es un péptido que confiere un ancla de glicosilfosfatidil inositol (GPI) en el primer componente, y el ligando pequeño es FK506 o un derivado de este.
- 15 8. La plataforma de suministro de fármacos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el enlazador peptídico es al menos un segmento de SGGS.
- 19 9. La plataforma de suministro de fármacos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína manipulada genéticamente se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO:1-2 o las SEQ ID NO:12-15.
- 20 10. La plataforma de suministro de fármacos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la célula diana para el trasplante es una célula inmunitaria y/o un linfocito T con receptor de antígeno quimérico (CAR), opcionalmente en donde la célula diana para el trasplante es una célula madre, una célula progenitora o una célula transplantada diseñada para sintetizar un compuesto bioquímico que es deficiente en un paciente.
- 25 11. La plataforma de suministro de fármacos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el conjugado de ligando pequeño tiene la fórmula I.

30



45

12. La plataforma de suministro de fármacos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ligando pequeño se conjuga además a un colorante fluorescente o una sonda radiactiva, o en donde el ligando pequeño se conjuga además a un regulador de la expresión génica endógena o un regulador de la expresión génica transducida.
- 50 13. La plataforma de suministro de fármacos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso en un método para modular un efecto de terapia celular, en donde: una célula diana identificada para trasplante, opcionalmente en donde la célula diana transplantada tiene una función de terapia celular, se pone en contacto con la plataforma de suministro de fármacos, la carga útil se libera dentro de la célula diana y modula la función de terapia celular de la célula diana, en donde opcionalmente la carga útil del fármaco se conjuga con un colorante fluorescente.
- 55 14. La plataforma de suministro de fármacos para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la función de terapia celular es proporcionar cirugía guiada ópticamente o controlar la proliferación de células diana, en donde opcionalmente la función de terapia celular es ejecutar citotoxicidad a la célula diana.
- 60 15. Una célula que comprende la plataforma de suministro de fármacos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la célula es una célula inmunitaria, tal como una célula CAR-T, en donde opcionalmente la célula es para su uso en el tratamiento del cáncer.

65

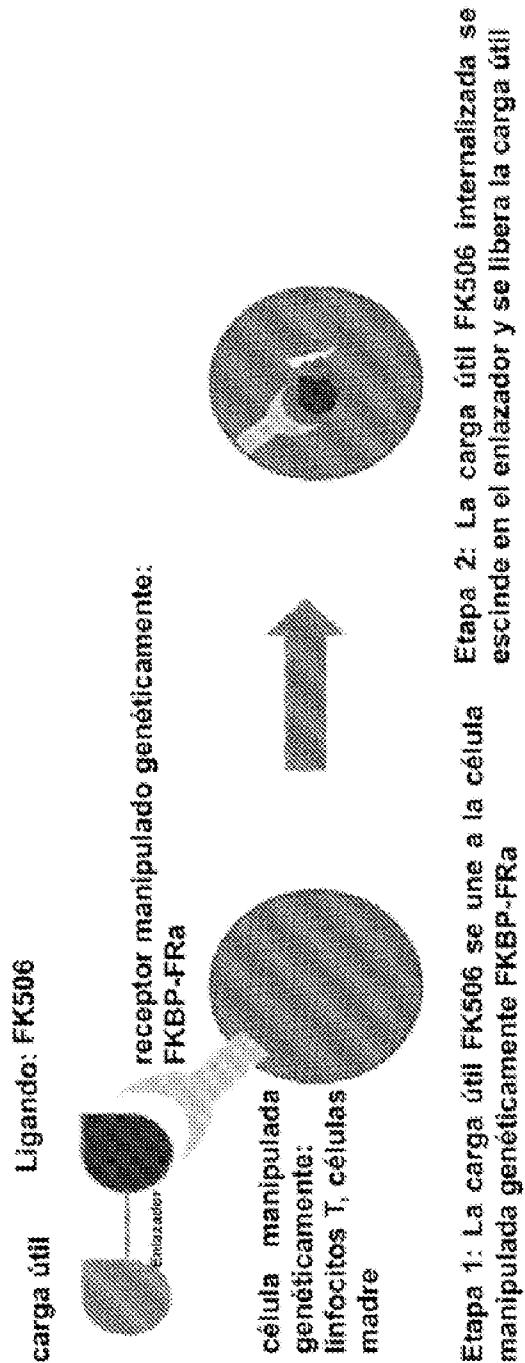


Figura 1A

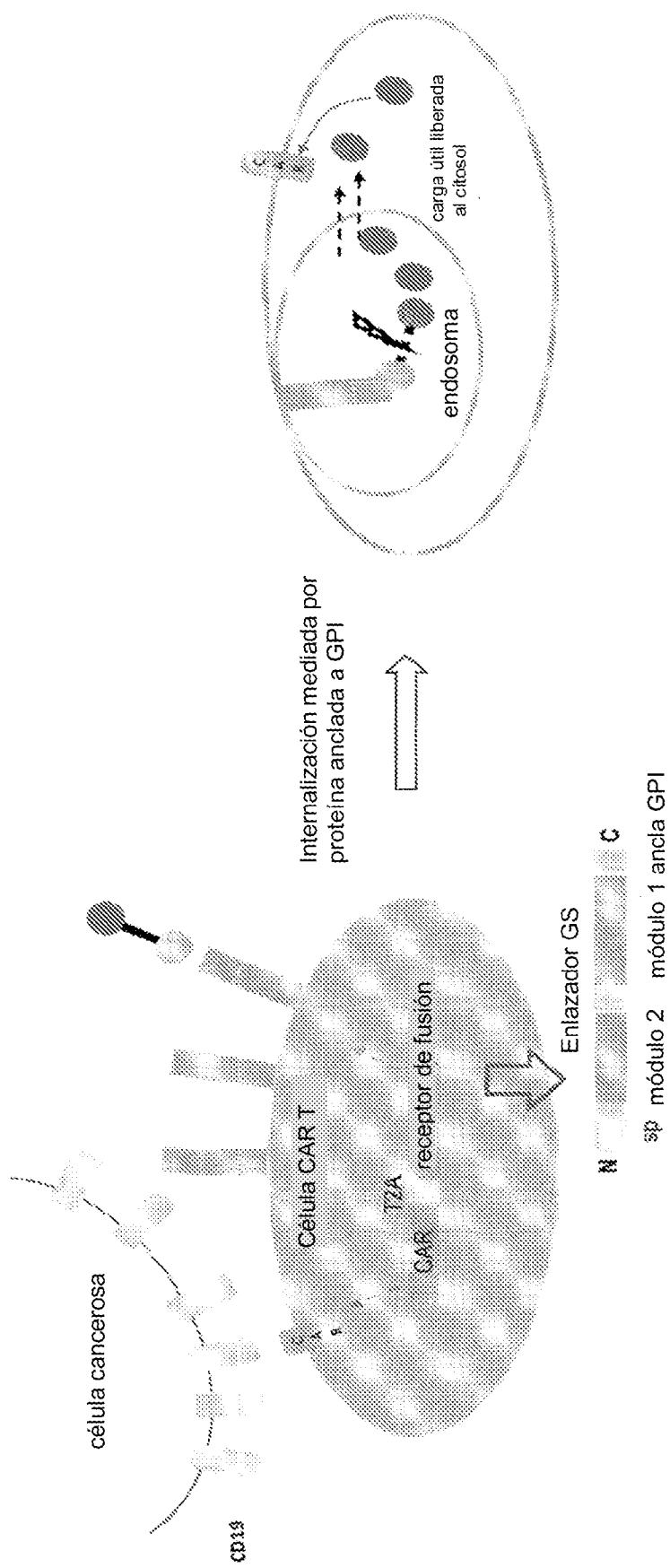


Figura 1B

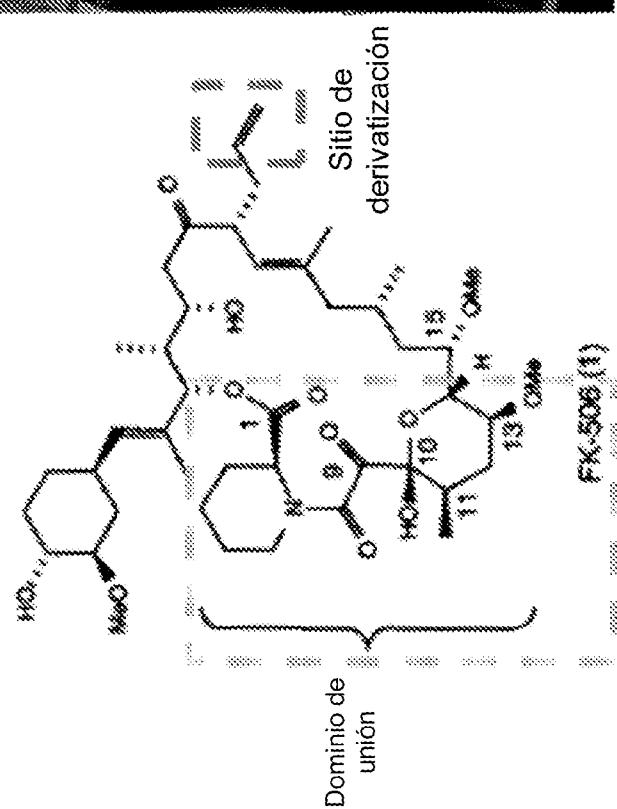
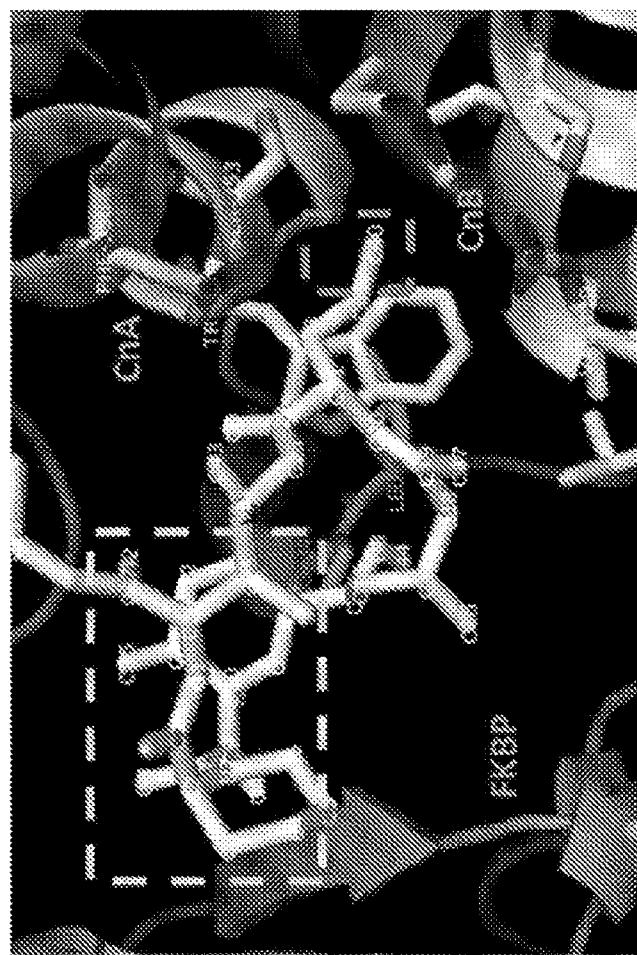


Figura 2A

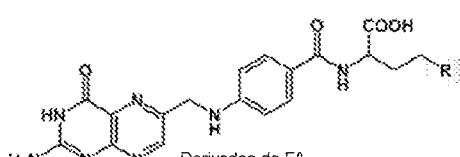
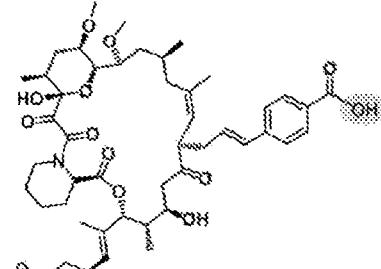
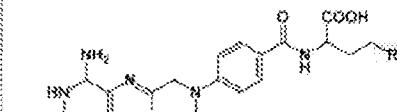
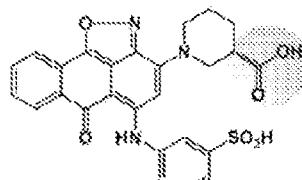
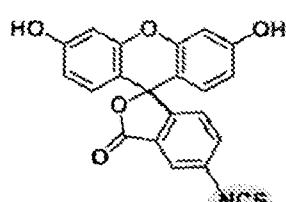
Módulo 1: proteína anclada a GPI		Módulo 2	
Proteína	Ligando	Proteína	Ligando
FRa	 <p>Derivados de FA</p>	FKBP	 <p>Derivados de FK506</p>
FRb		DHFR	 <p>Derivados de MTX</p>
uPAR		FITC contra scFv	 <p>Derivados de FITC</p>
		DNP contra scFv	<p>DNP-Ser</p>

Figura 2B

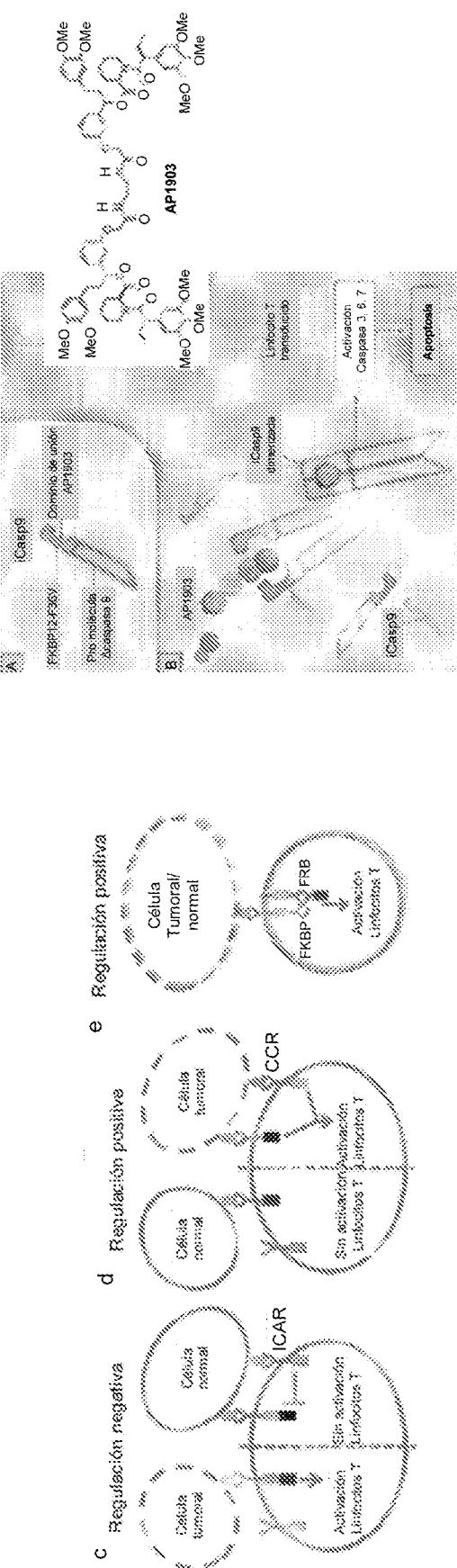


Figura 3

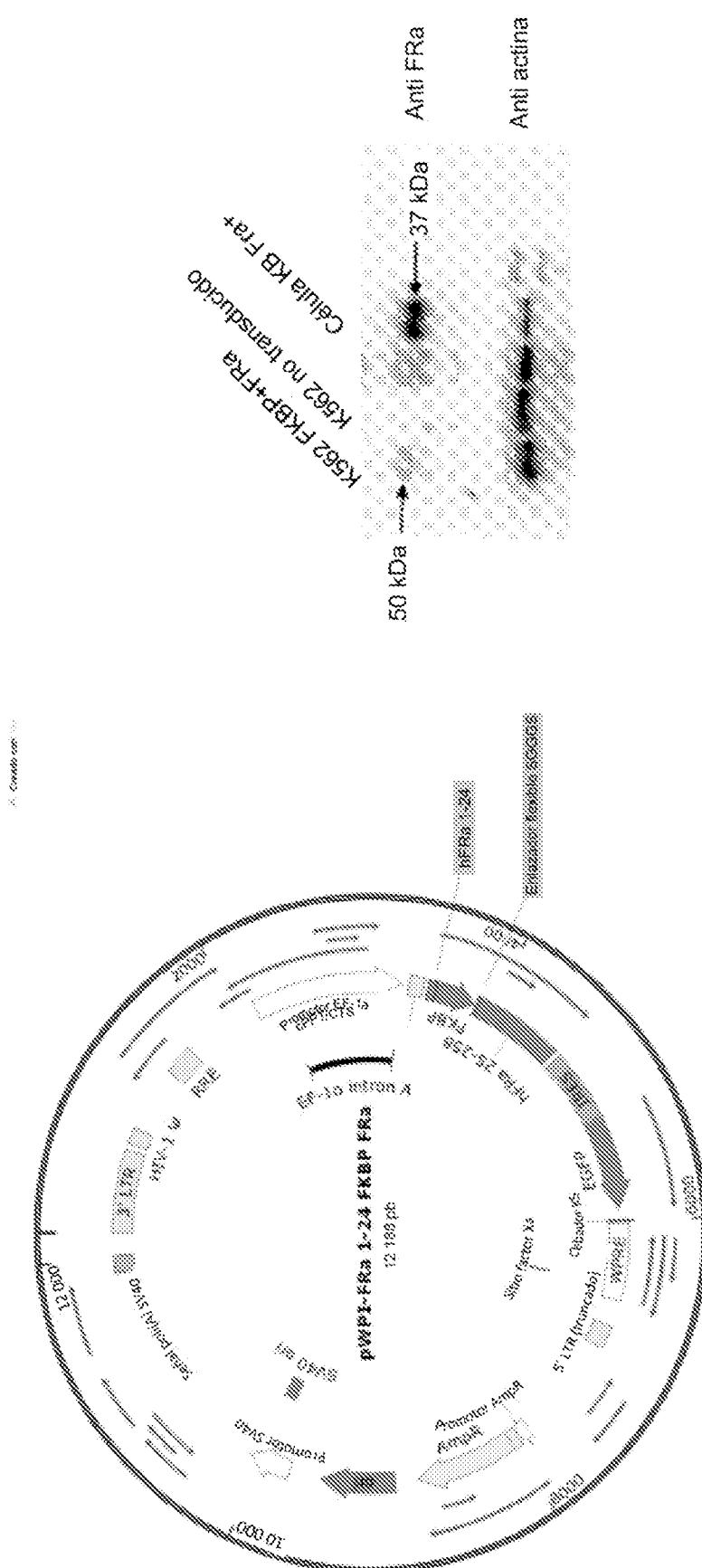


Figura 4A

Figura 4B

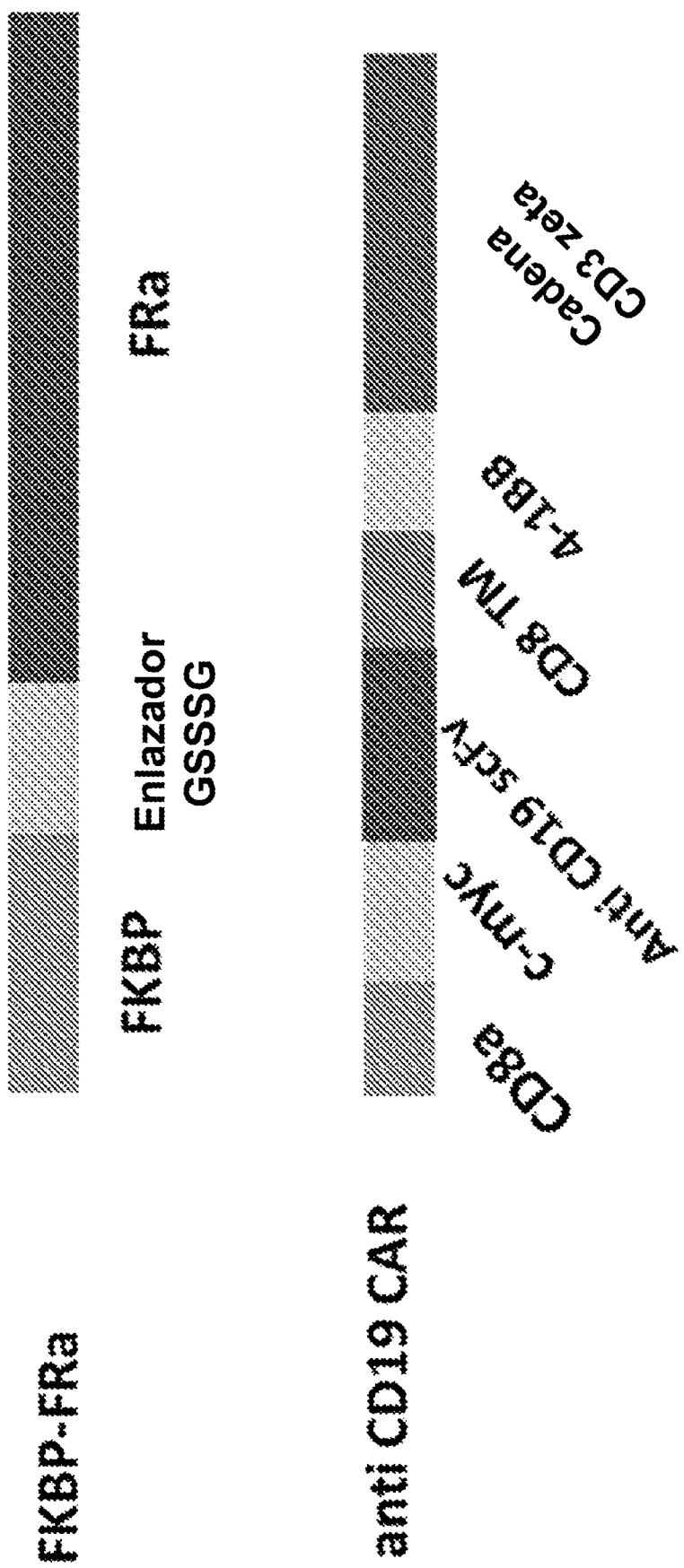


Figura 4C

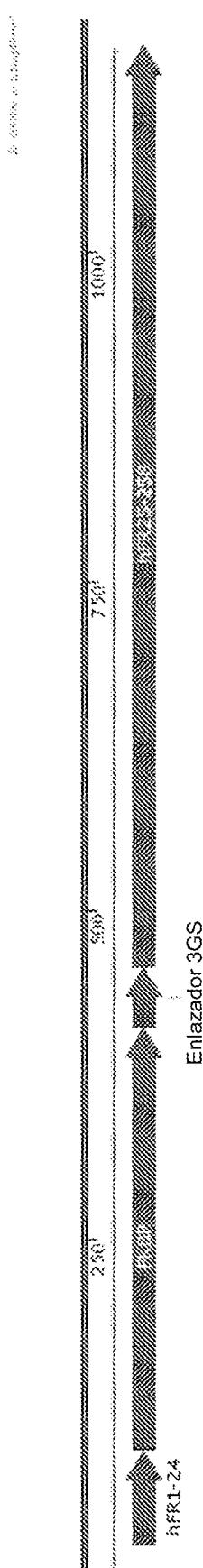


Figura 4D

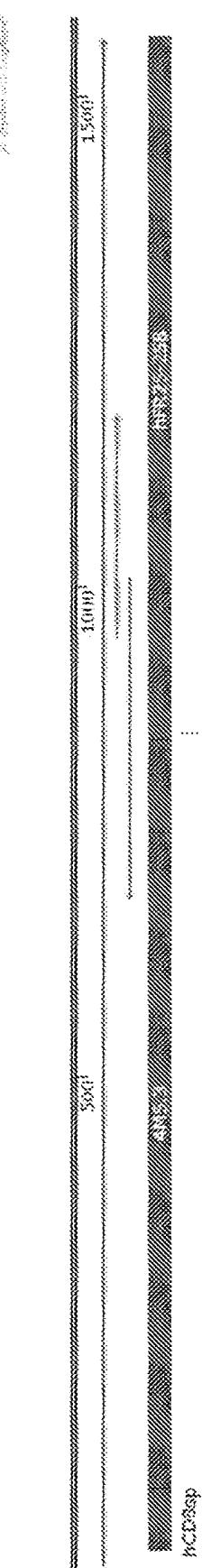


Figura 4E

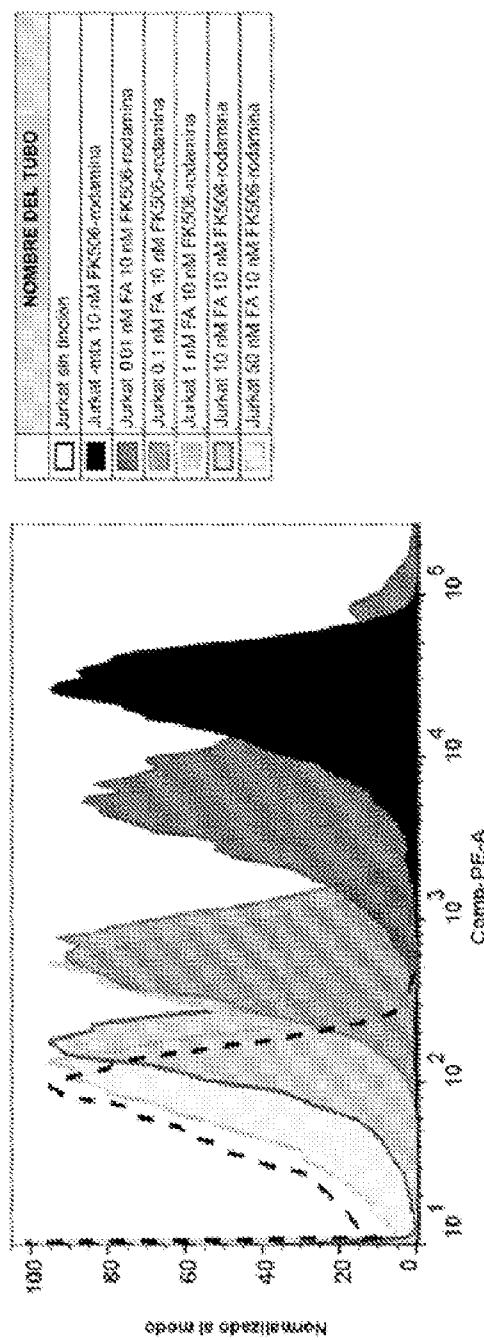


Figure 5

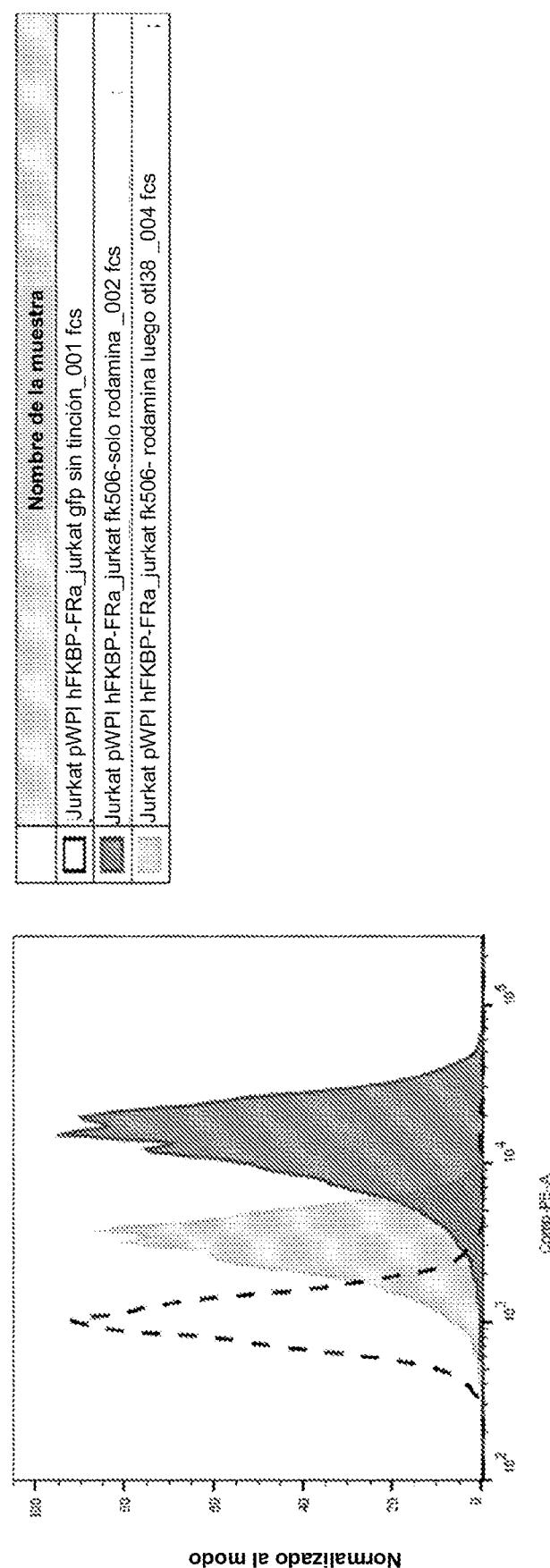


Figura 6

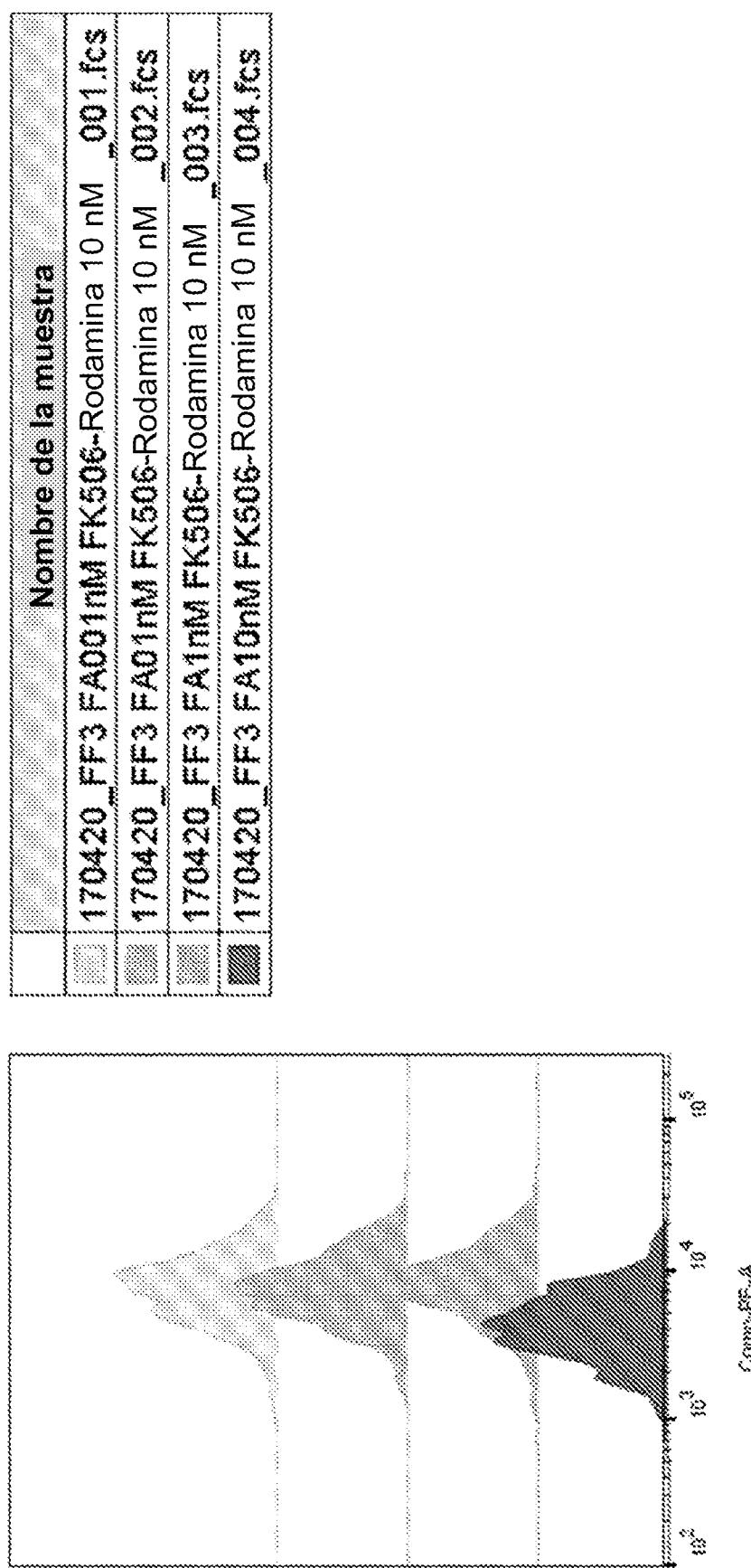


Figura 7

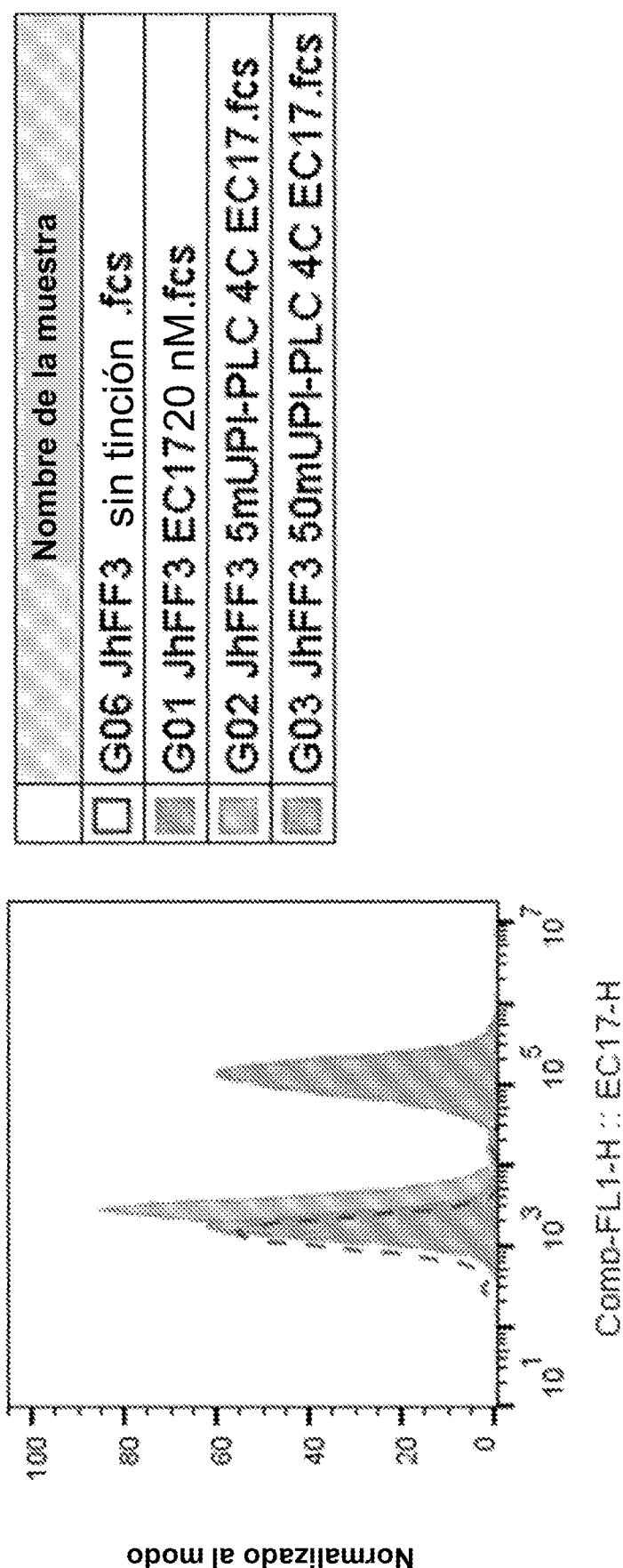


Figura 8

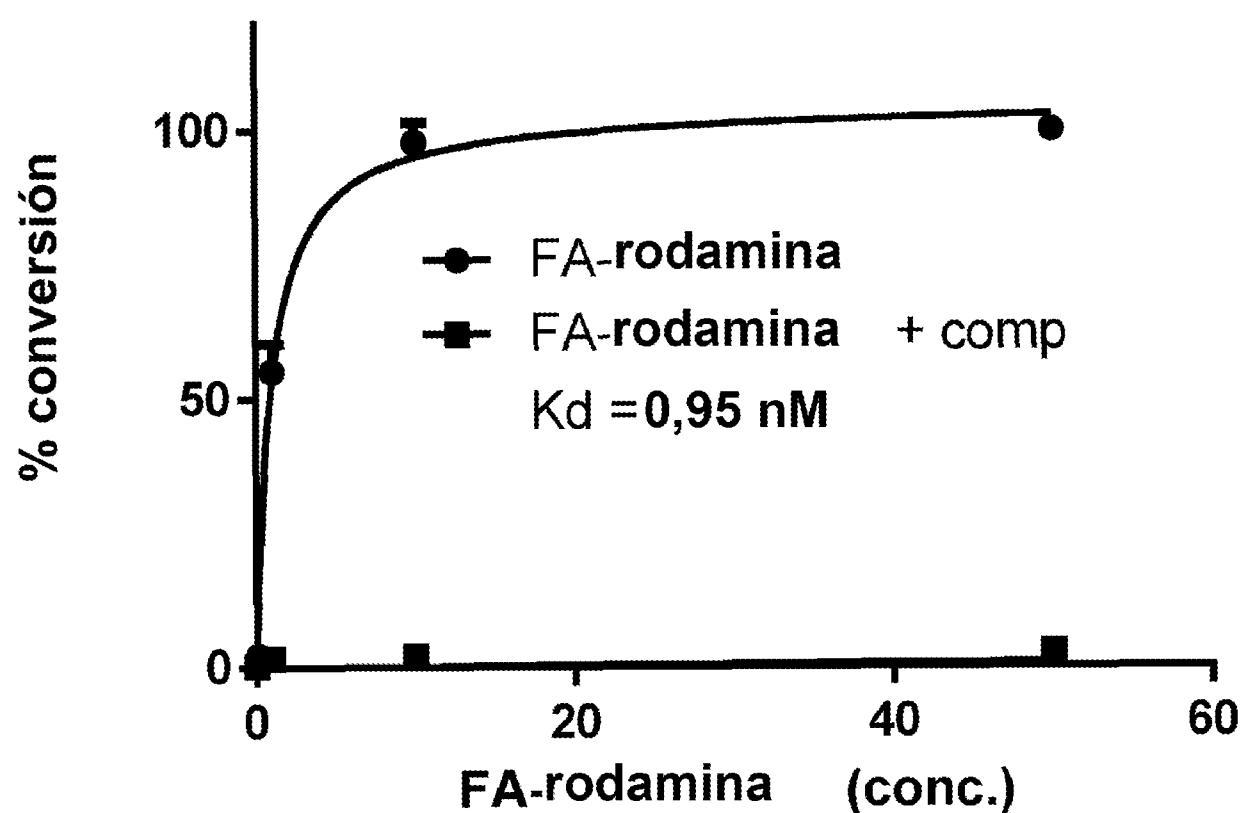


Figura 9

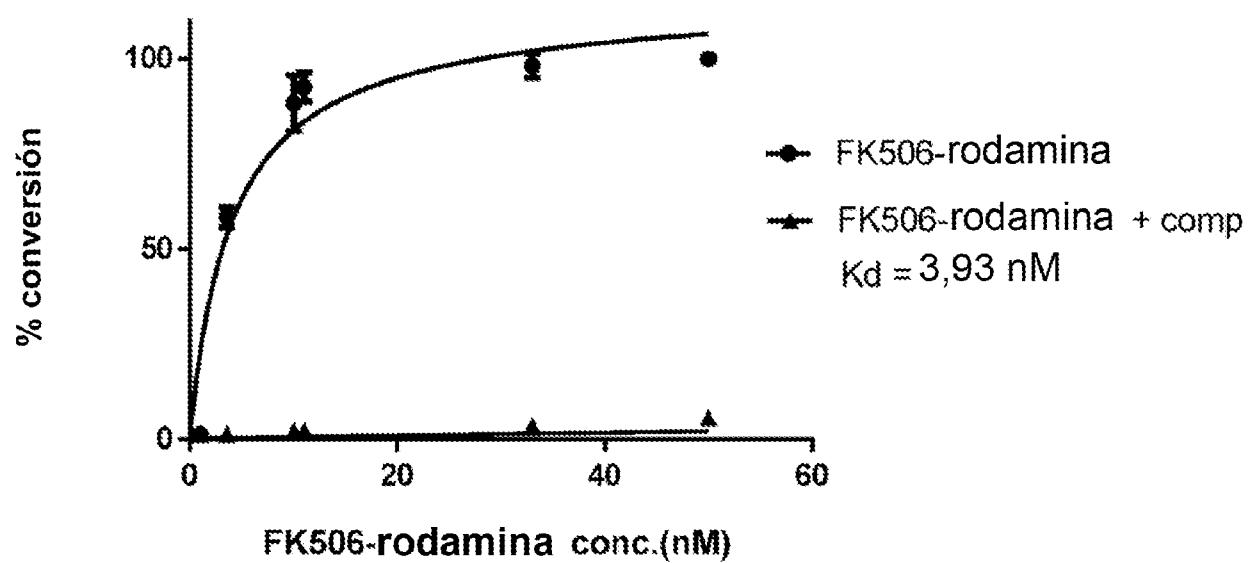


Figura 10

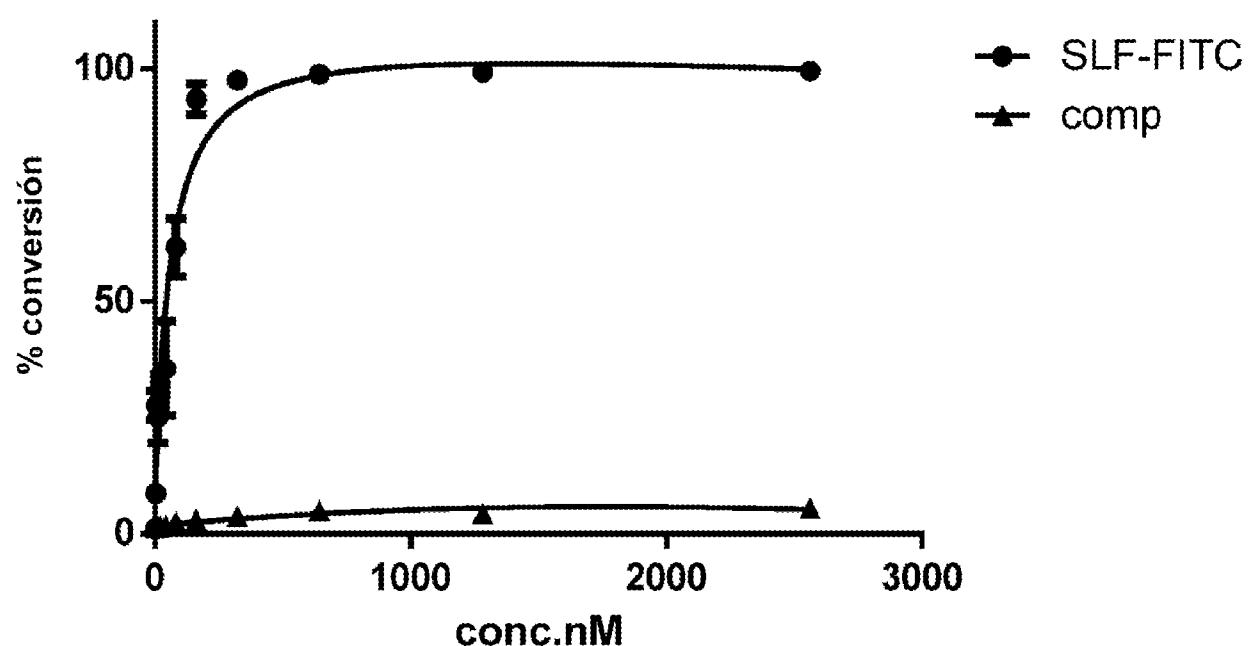


Figura 11

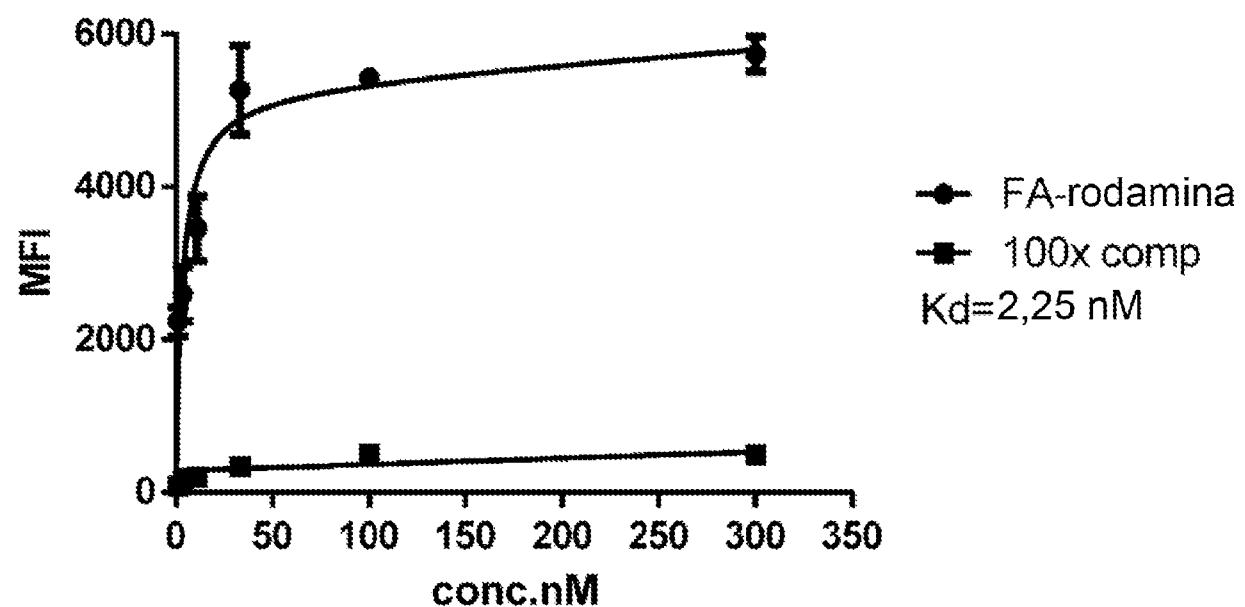


Figura 12

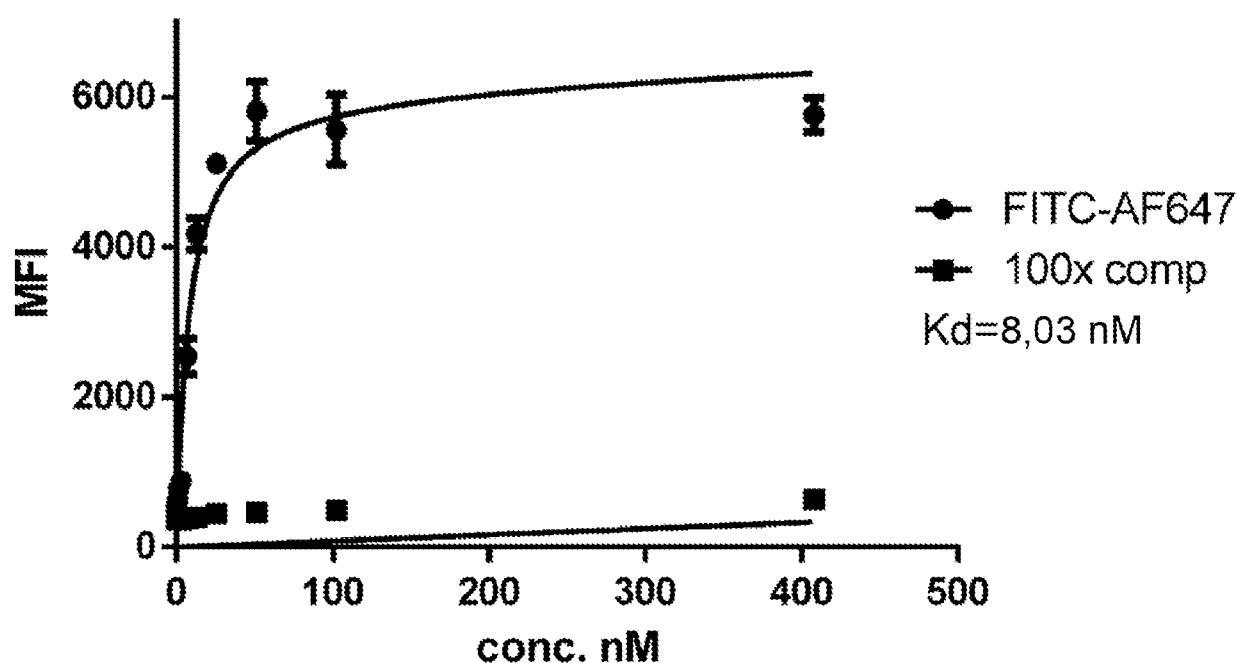


Figura 13

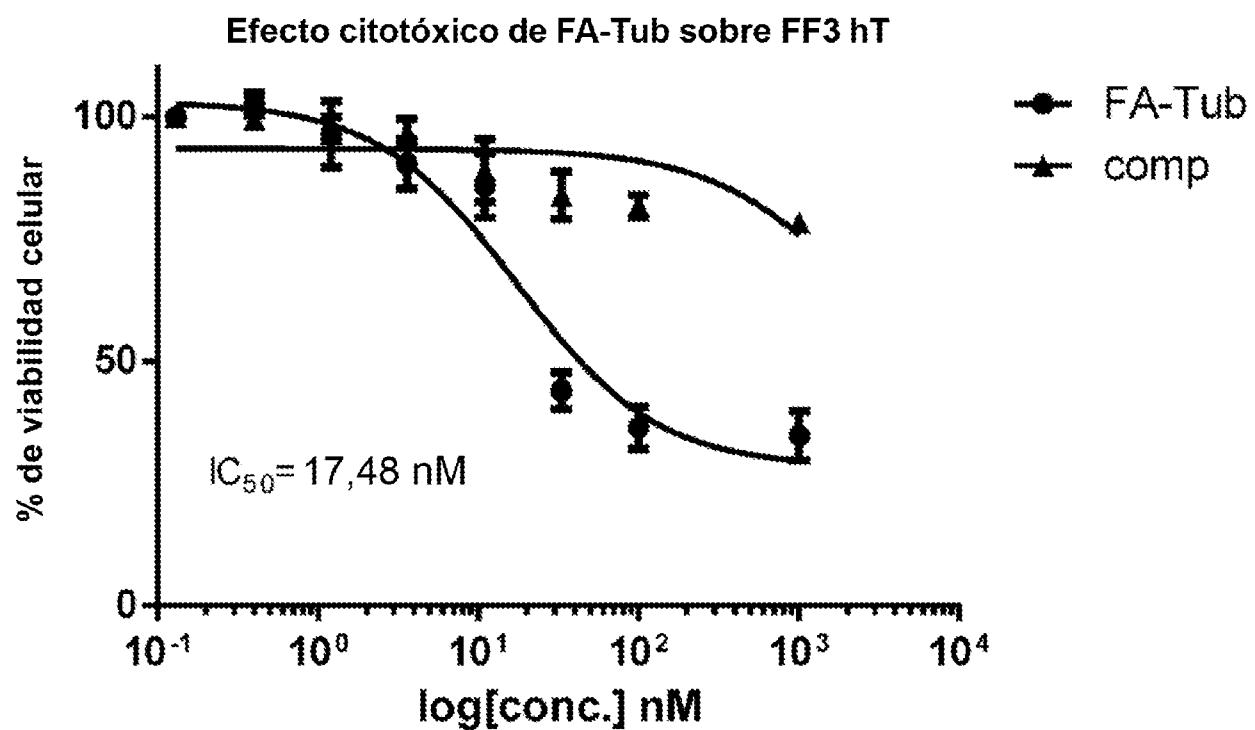


Figura 14

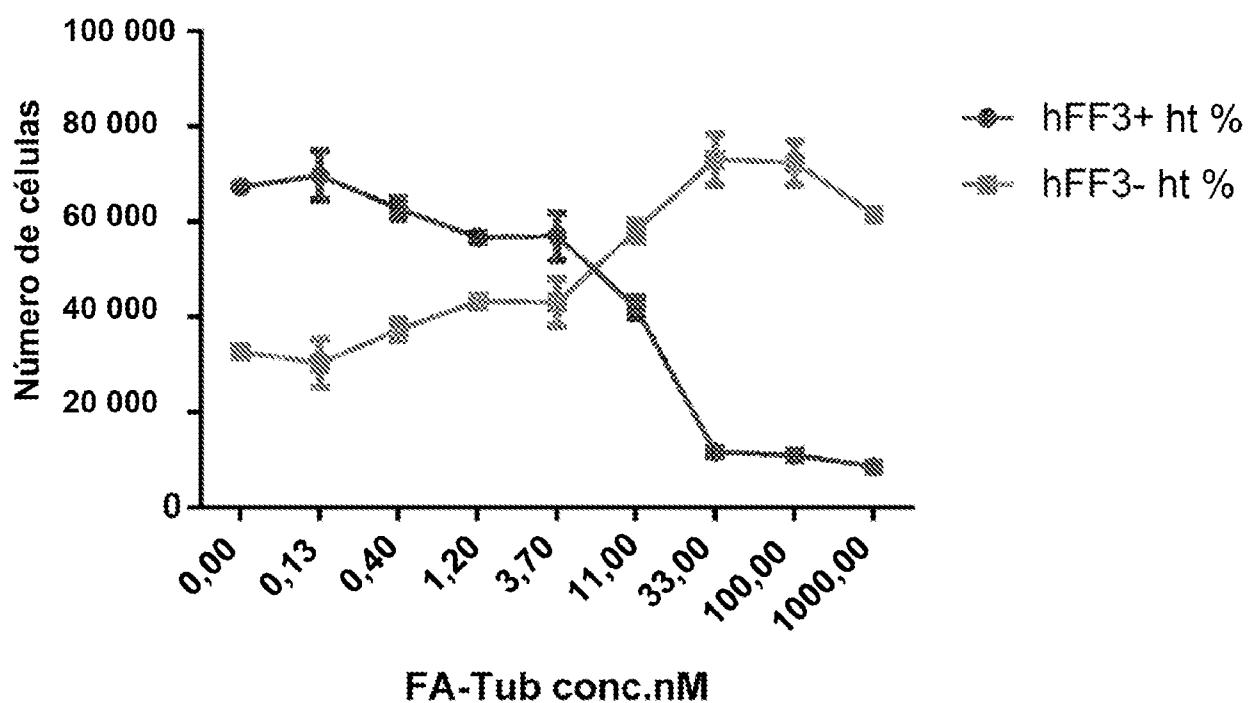


Figura 15

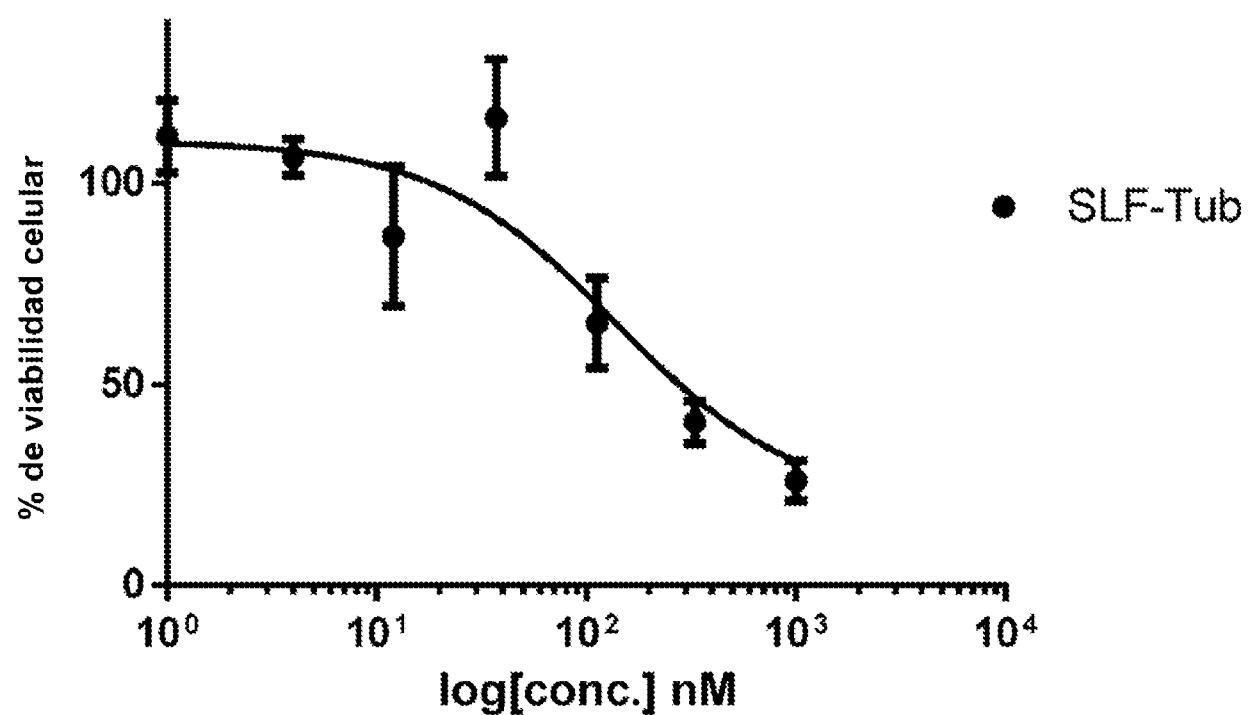


Figura 16

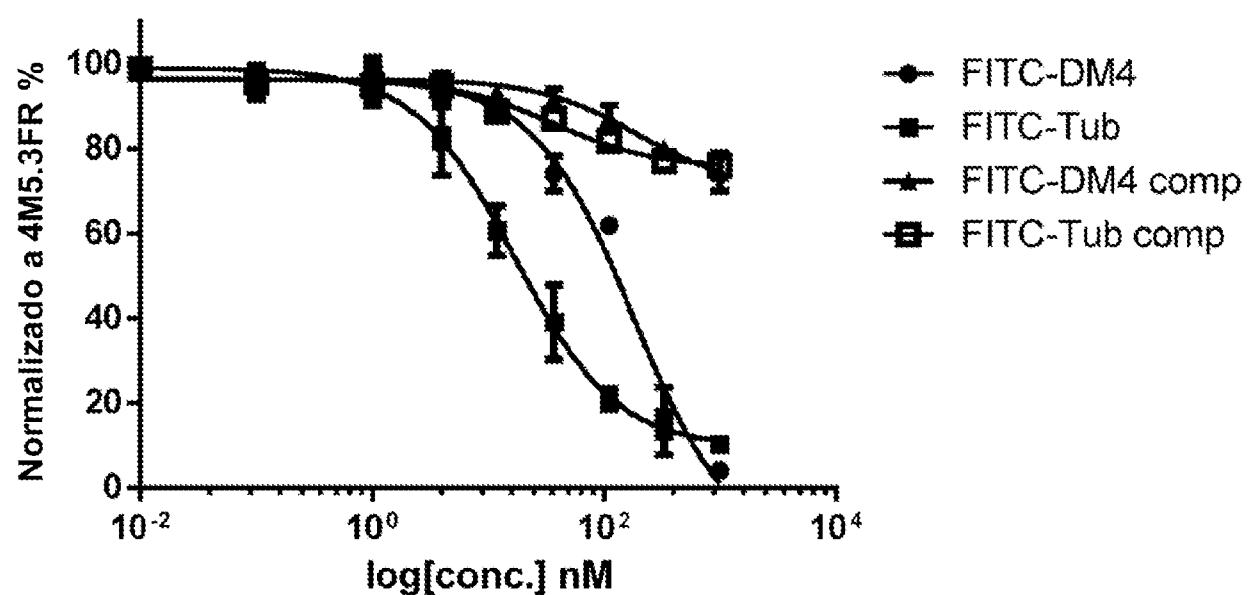


Figura 17

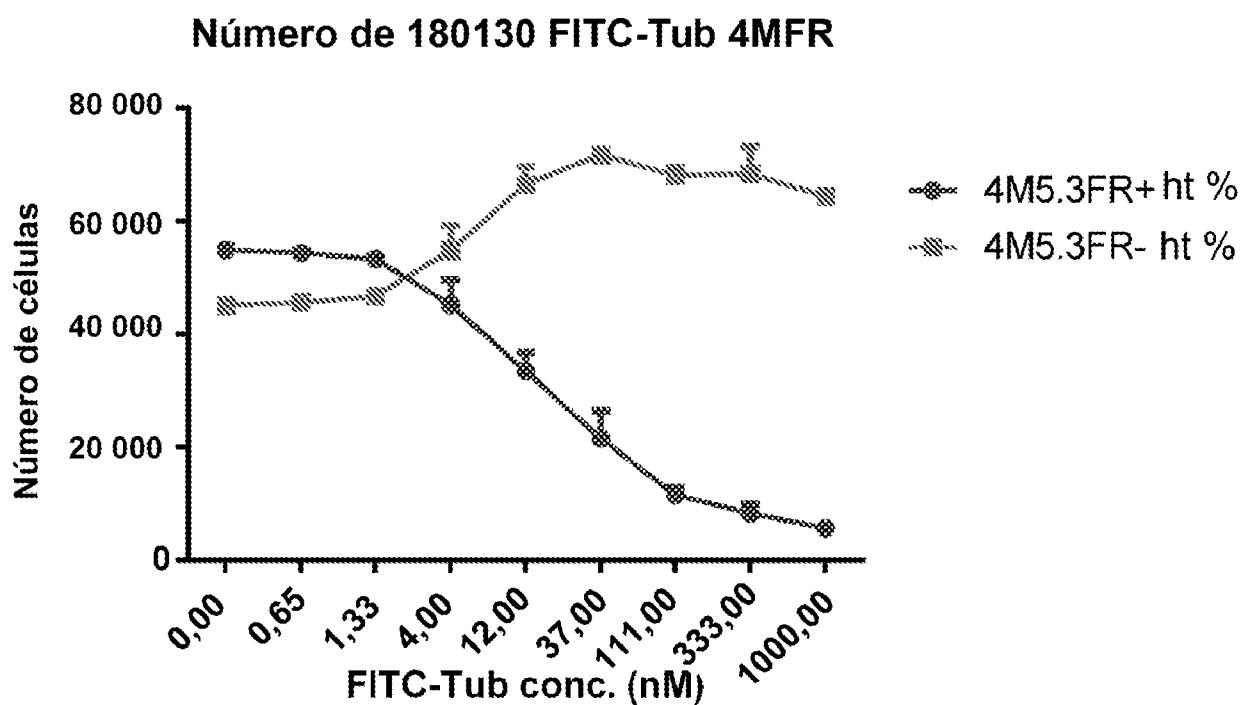


Figura 18

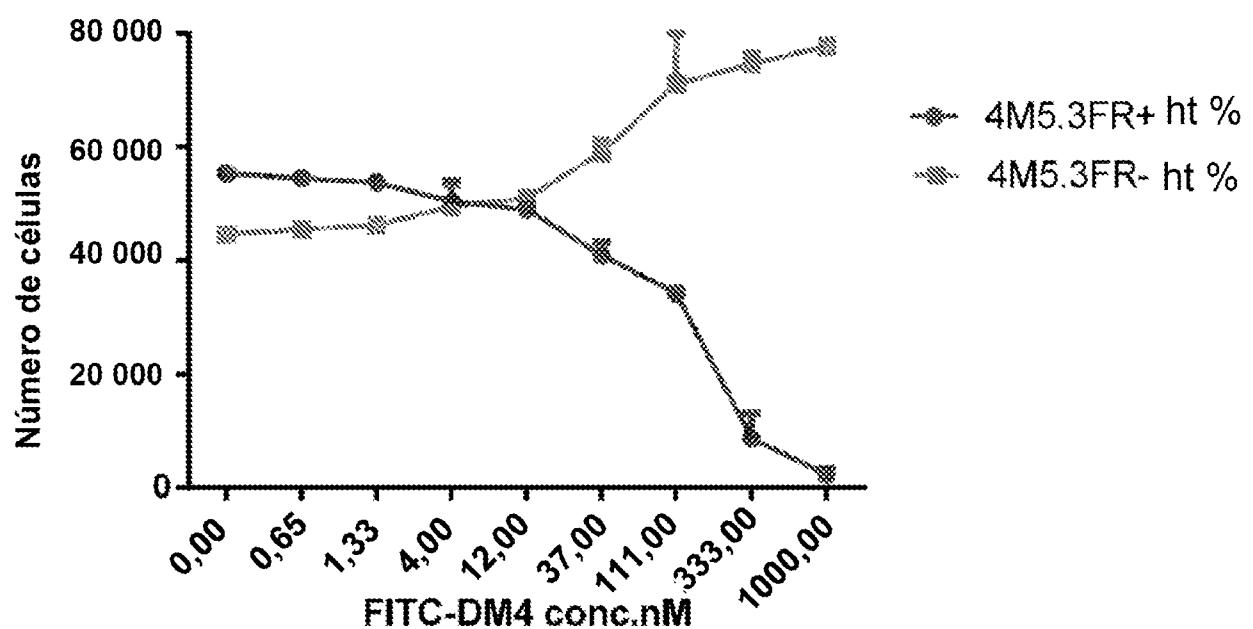


Figura 19

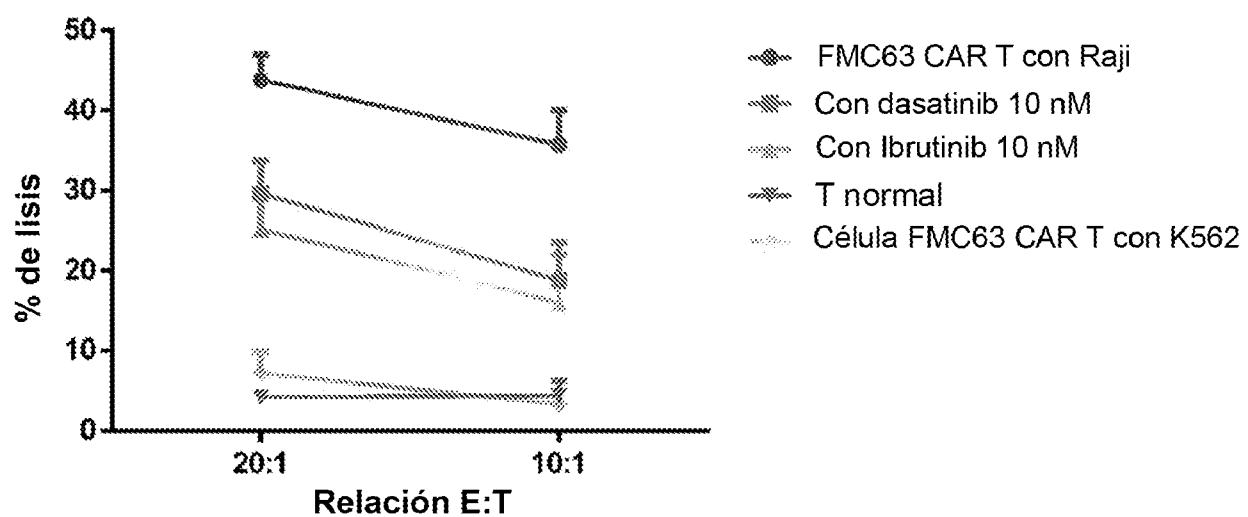


Figura 20

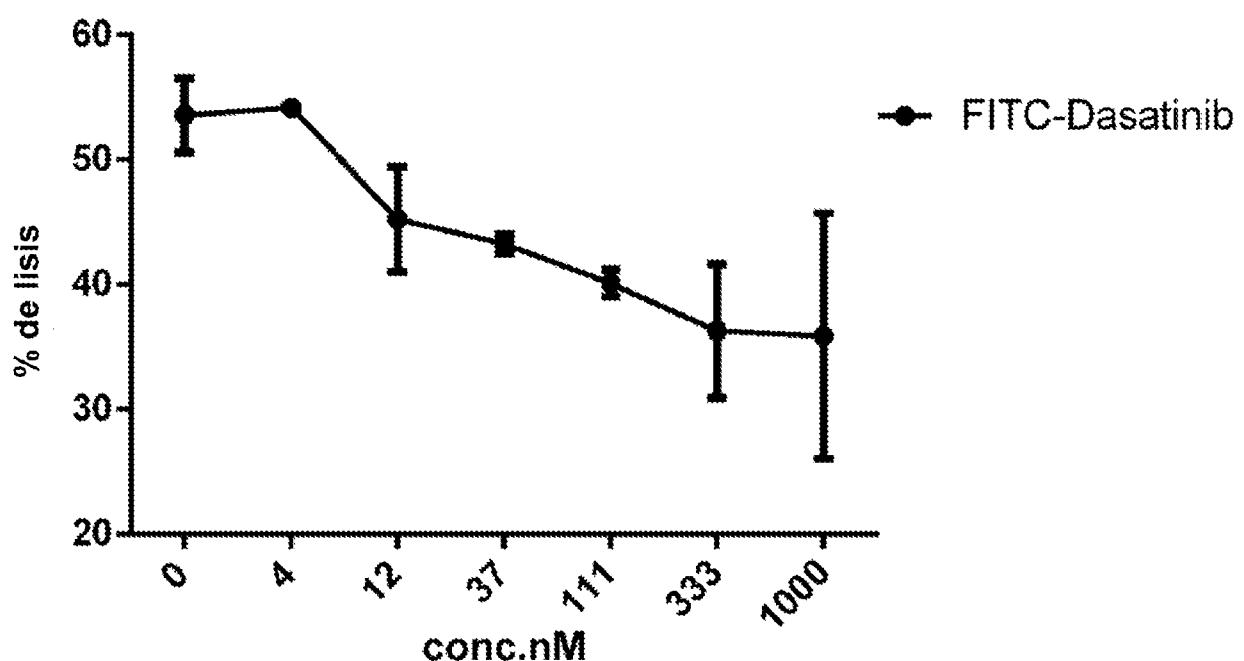


Figura 21

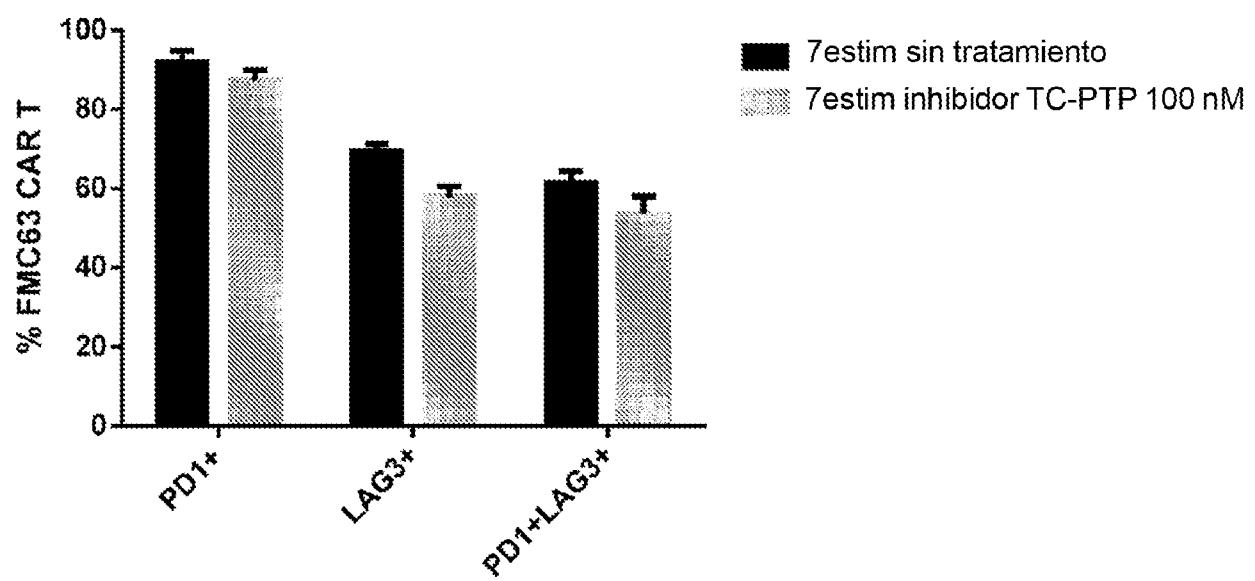


Figura 22