



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 971 550**

⑮ Int. Cl.:

A61K 35/17 (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 51/08 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 14/72 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2017** PCT/US2017/046630

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2018** WO18052594

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2017** E 17851258 (8)

⑨ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2023** EP 3522718

⑮ Título: **Receptor de antígeno quimérico de dominio I específico para ICAM-1**

⑩ Prioridad:

02.09.2016 US 201662383139 P
09.11.2016 US 201662419817 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2024

⑯ Titular/es:

CORNELL UNIVERSITY (100.0%)
395 Pine Tree Road, Suite 310
Ithaca, NY 14850, US

⑯ Inventor/es:

JIN, MOONSOO

⑯ Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 971 550 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

Receptor de antígeno quimérico de dominio I específico para ICAM-1

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a receptores de antígenos quiméricos específicos para ICAM-1 que comprenden el dominio I humano. La invención se refiere particularmente a receptores de antígenos quiméricos que comprenden dominios I humanos que tienen diferentes afinidades a ICAM-1. En más detalle, los dominios I de la presente invención comprenden específicamente los aminoácidos 130-310 de la ID. DE SEC. N.º: 1 con una mutación de F292A, F292S, L289G, F265S o F292G, y se unen a ICAM-1 a una afinidad entre aproximadamente 119 nM y aproximadamente 20 μ M de Kd.

10 **Antecedentes de la invención**

La inmunoterapia está emergiendo como un enfoque altamente prometedor para el tratamiento del cáncer.

La modificación genética de las células T con CAR es un enfoque común para diseñar células T específicas de tumor. Las células T CAR (receptor de antígeno quimérico) dirigidas a antígenos asociados a tumor pueden infundirse en pacientes (transferencia celular adoptiva o ACT) que representan un enfoque de inmunoterapia eficiente. La ventaja de la tecnología CAR-T en comparación con la quimioterapia o el anticuerpo es que las células T modificadas por ingeniería genética reprogramadas pueden proliferar y persistir en el paciente y trabajar como un fármaco vivo.

15 Las moléculas de CAR se componen de restos de unión sintéticos, típicamente una variable de fragmento monocatenario derivada de anticuerpos (svFv) o cualquier elemento de detección de antígeno nativo, fusionado a dominios de señalización intracelular que se componen de la cadena zeta de TCR y moléculas coestimuladoras tales como 20 CD28 y/o 4-1BB^{1,2}. Las ventajas del direccionamiento mediado por CAR incluyen: 1) la provisión de señales de activación, proliferación y supervivencia in-cis a través de un único evento de unión, en comparación con la señalización coestimuladora y del TCR natural no integrado; 2) la capacidad de eludir la regulación negativa del CMH por parte de las células tumorales mediante el reconocimiento de antígenos independiente del CMH; y 3) un umbral de activación reducido, así como el reconocimiento de células tumorales con baja densidad de antígeno, gracias a la interacción de alta afinidad entre el 25 CAR y el antígeno 3,4.

El antígeno diana de CAR ideal sería un neoantígeno tumoral nativo expuesto en la superficie que está altamente expresado y es indetectable en tejidos sanos. Sin embargo, debido a la rareza implícita de tales antígenos, muchos de los antígenos de tumores sólidos que suelen ser diana también se expresan en tejidos no tumorales, aunque a niveles más bajos. Las moléculas CAR con alta afinidad por dichos antígenos pueden provocar una afectación colateral de los tejidos sanos, lo que se traduce en una toxicidad en el objetivo y fuera del tumor, un importante factor que limita el progreso de la terapia con células T CAR hasta la fecha.

30 Los CAR convencionales se construyen usando un formato de anticuerpo monocatenario, y se modifican por ingeniería genética selectivamente para poseer afinidades nanomolares suba bajas para antígenos diana. Sin embargo, el aumento de la sensibilidad de las células T CAR puede ser una ventaja sólo cuando se dirige a antígenos tumorales verdaderos o a aquellos con los niveles más altos de restricción^{17, 36}. De lo contrario, el aumento de la sensibilidad se produce al precio de una selectividad reducida, con lisis de las células que expresan la diana de una manera en gran medida insensible a la densidad del antígeno¹⁸.

35 El documento US 2014/0242701 A1 proporciona un CAR que comprende un dominio extracelular capaz de unirse a un antígeno, un dominio transmembrana y al menos un dominio intracelular, en el que el dominio intracelular incluye un dominio intracelular de un receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GrFTR).

40 El documento US 2008/0311130 A1 proporciona un polipéptido aislado capaz de unirse a ICAM-1, que comprende el dominio de integrina α L I o una porción biológicamente activa del mismo, en el que uno o más residuos están sustituidos, en el que el polipéptido sustituido se une a ICAM-1 con mayor afinidad que la proteína de integrina α L de tipo natural.

45 Sin embargo, existe la necesidad de CAR con un índice terapéutico mejorado, es decir, CAR que puedan destruir el tumor mientras se minimiza la toxicidad sistémica.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1G muestran la construcción de CAR específicos de ICAM-1 con variaciones escalonadas de 10⁶ veces en afinidad y sus resultados *in vitro*.

50 FIG. 1A: Esquema de LFA-1 en complejo con ICAM-1. Las cadenas α y β y los dominios modulares de la integrina LFA-1 están marcados. Los iones metálicos necesarios para la interacción entre LFA-1 e ICAM-1 se muestran en círculos.

FIG. 1B: El modelo estructural del dominio I de LFA-1 y el dominio N-terminal de ICAM-1 (D1) están dibujados en diagrama de cinta. Se indican los extremos N-terminal y C-terminal y los puntos calientes mutacionales.

5 FIG. 1C: Sensograma SPR de las variantes del dominio I uniéndose a ICAM-1 humana inmovilizada, excepto F265S/F292G*, que se hizo fluir sobre ICAM-1 murina (adaptado de la figura 2 de Jin et. al.⁵⁴, y de la figura 1 de Wong et. al⁵⁵).

FIG. 1D: Un esquema del vector lentivirus que codifica el CAR del dominio I. LTR = repetición terminal larga; SD = donante de corte y empalme; SA = aceptor de corte y empalme; ψ^+ = señal de empaquetamiento; SS = secuencia señal; TM = transmembrana; Cyt = dominio citosólico.

10 FIG. 1E: Unión de anticuerpos anti-Myc a células T Jurkat transducidas con CAR marcados con Myc (TM, F292G, F292A y dominio I WT). NT = no transducido.

FIG. 1F: Unión de ICAM-1-Fc recombinante a los CAR expresados en células HEK 293T.

FIG. 1G: Ensayo de adhesión de fondo V que mide las afinidades de unión relativas entre los CAR de dominio I expresados en células T Jurkat y superficies recubiertas de ICAM-1 humanas (superiores) solubles y murinas (inferiores). n=3; p < 0,01 para * frente a NT mediante la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

15 **Las figuras 2A-2D muestran la activación dependiente de la afinidad y la densidad de antígeno de células T CAR primarias *in vitro*.**

20 FIG. 2A: Ensayo de efecto con respecto a diana (E:T) para medir la destrucción de diana por células T primarias transducidas con diferentes CAR de dominio I. Cada diana se incubó por separado con células T CAR TM, F292G, F292A o WT en una razón E:T de 5:1. El porcentaje de viabilidad se normalizó con respecto a la luminiscencia de las células diana incubadas con células T NT (n=3, \pm = desviación estándar [DE]).

Se usó una ecuación de curva sigmoidal de pendiente variable para ajustar los datos. p < 0,01 para * frente a NT mediante la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. FIG. 2B: Los mejores valores de ajuste de 50 % de destrucción y la pendiente de Hill de la ecuación sigmoidea se representaron frente a las afinidades de los CAR de dominio I. Se representaron los valores de mejor ajuste con valores r-cuadrado superiores a 0,85.

25 FIG. 2C: Expresión ICAM-1 en células T primarias en comparación con las células HeLa. Los histogramas grises y negros corresponden a células no marcadas y células marcadas con anticuerpos R6.5, respectivamente.

FIG. 2D: La liberación de IFN- γ se midió mediante ELISA para cada variante CAR T tras la coincubación con diferentes células diana durante 24 h (n=3). p < 0,01 para * frente a 8505C/-ICAM-1 mediante la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

30 **Las figuras 3A-3C muestran que las células T CAR de afinidad micromolar proporcionan una erradicación tumoral, una supresión de la recaída tumoral y un beneficio de supervivencia superiores.**

FIG. 3A: Se usaron imágenes de luminiscencia de cuerpo entero para estimar la carga tumoral en ratones infundidos con diferentes variantes de células T CAR 8 días después de la implantación del tumor. Sin T = los ratones no recibieron células T.

35 FIG. 3B: Los ratones se trataron con células T CAR 10 días después de la implantación del tumor. NT = células T no transducidas.

FIG. 3C: Curvas de supervivencia de ratones que reciben diferentes tratamientos. Los valores de prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox) frente a NT no son significativos para sin T y TM, y p = 0,008 para F292G, p = 0,025 para R6,5, y p = 0,0016 para F292A.

40 **Las figuras 4A-4D muestran mediciones longitudinales y concurrentes de la carga tumoral, distribución de células T y liberación de citocinas.**

FIG. 4A: Esquema de vector de dominio SSTR2-I.

45 FIG. 4B: Mediciones longitudinales de la captación de NOTAOCT mediante PET/TC (mitad superior de cada panel) y de la carga tumoral mediante imágenes de luminiscencia de cuerpo entero (mitad inferior de cada panel). Las imágenes son representativas de cuatro ratones en cada cohorte. Las imágenes PET/TC de cuerpo entero, tomadas el día de máxima captación del trazador, se muestran en el extremo derecho. Los puntos temporales de formación de imágenes se indican debajo del panel inferior. Por ejemplo, 15 representa 15 días después del xenoinjerto tumoral (y 7 días después de la infusión de células T).

FIG. 4C: Cuantificación de la luminiscencia y la captación del trazador en los pulmones de ratones tratados tal como se indica. Panel superior: Células T NT (no transducidas). Nivel inferior: CAR-F292A.

FIG. 4D: Los niveles de citocinas medidos a partir de la sangre dibujada en diversos puntos de tiempo de los mismos ratones en "b" y "c" se representan (media \pm DE, mediciones duplicadas). Panel superior: Células T NT (no transducidas). Nivel inferior: CAR-F292A.

5

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$ del valor mencionado.

10 Tal como se usa en el presente documento, "terapia de células T adoptivas" implica el aislamiento y expansión ex vivo de células T específicas de tumor para lograr un mayor número de células T que lo que podría obtenerse por vacunación sola. A continuación, las células T específicas del tumor se infunden en pacientes con cáncer en un intento de dotar a su sistema inmunitario de la capacidad de sobrecargar el tumor restante mediante células T que puedan atacar y destruir el cáncer.

15 Tal como se usa en el presente documento, "afinidad" es la fuerza de unión de una sola molécula (por ejemplo, dominio I) a su ligando (por ejemplo, ICAM-1). La afinidad suele medirse y notificarse mediante la constante de disociación en equilibrio (KD o Kd), que se utiliza para evaluar y clasificar las fuerzas de las interacciones bimoleculares.

20 Tal como se usa en el presente documento, un "receptor de antígeno quimérico (CAR)" significa una proteína fusionada que comprende un dominio extracelular capaz de unirse a un antígeno, un dominio transmembrana derivado de un polipéptido diferente de un polipéptido del que se deriva el dominio extracelular y al menos un dominio intracelular. El "dominio extracelular capaz de unirse a un antígeno" significa cualquier oligopéptido o polipéptido que pueda unirse a un cierto antígeno. El "dominio intracelular" significa cualquier oligopéptido o polipéptido que se sabe que funciona como un dominio que transmite una señal para causar la activación o inhibición de un proceso biológico en una célula.

25 Tal como se usa en el presente documento, un "dominio" significa una región en un polipéptido que se pliega en una estructura particular independientemente de otras regiones.

30 Tal como se usa en el presente documento, "integrina" o "receptor de integrina" (usado indistintamente) se refiere a cualquiera de las muchas proteínas receptoras de superficie celular, también denominadas receptores de adhesión que se unen a ligandos de matriz extracelular u otros ligandos de proteínas de adhesión celular mediante de este modo procesos de adhesión celular y de célula celular. La afinidad de unión de las integrinas a sus ligandos está regulada por cambios conformatacionales en la integrina. Las integrinas están implicadas en procesos fisiológicos tales como, por ejemplo, embriogénesis, hemostasia, cicatrización de heridas, respuesta inmunitaria y formación/mantenimiento de la arquitectura de tejido. Las subfamilias integrales contienen una subunidad beta combinada con diferentes subunidades alfa para formar receptores de proteínas de adhesión con diferentes especificidades.

35 "Molécula de adhesión intercelular 1" o "ICAM-1", es decir, números de registro de GenBank NM_000201, NP_000192, es el ligando para integrina α L β 2, y su dominio N-terminal (D1) se une al dominio I α L a través de la coordinación del residuo ICAM-1-Glu-34 en el metal MIDAS. ICAM1 se expresa típicamente en células endoteliales y células del sistema inmunitario. ICAM1 se une a integrinas de tipo α L β 2 y α M β 2. ICAM-1 se regula por incremento en varios carcinomas y el estroma asociado²⁴ así como en afecciones inflamatorias²⁵. Aparte de los tejidos enfermos, ICAM-1 se expresa basalmente en varios tipos de células que incluyen células endoteliales, células inmunitarias y algunas células epiteliales²⁵.

40 "Antígeno 1 asociado a la función de linfocitos", "LFA-1", "integrina α L β 2" o "CD 18/CD11a" se refiere a un miembro de la subfamilia de integrina leucocítica. LFA-1 se encuentra en todas las células T y también en células B, macrófagos, neutrófilos y células NK y está implicada en el reclutamiento en el sitio de infección. Se une a ICAM-1 en células presentadoras de antígeno y funciona como una molécula de adhesión.

45 Tal como se usa en el presente documento, "dominio I" se refiere al dominio insertado o I de la subunidad α L de LFA-1 y es un mediador alostérico de la unión del ligando al LFA-1. El dominio I es un ligando nativo de ICAM-1. El sitio de unión a ligando del dominio I, conocido como un sitio de adhesión dependiente de iones metálicos (MIDAS), existe como dos conformaciones distintas reguladas alostéricamente por la hélice α 7 C-terminal. Un dominio I de tipo natural (WT) abarca los residuos de aminoácidos 130-310 de la proteína de subunidad de integrina α L madura de 1145 aminoácidos de longitud (ID. DE SEC. N.^o: 1, que son los residuos de aminoácidos 26-1170 del n.^o de registro de GenBank NP_002200). Toda la numeración de los residuos de aminoácidos utilizada en el presente documento se refiere a la secuencia de aminoácidos de la integrina α L madura (ID. DE SEC. N.^o: 1), en donde el residuo 1 de ID. DE SEC. N.^o: 1 corresponde al residuo 26 de la secuencia del n.^o de registro de GenBank NP_002200. En más detalle, el dominio I de la presente invención comprende los aminoácidos 130-310 de la ID. DE SEC. N^o1 con una mutación de F292A, F292S, L289G, F265S o F292G.

Tal como se usa en el presente documento, un "antígeno tumoral" significa una molécula biológica que tiene antigenicidad, cuya expresión causa cáncer.

Descripción

- 5 La presente invención proporciona receptores de antígeno quiméricos dirigidos a ICAM-1, que es un biomarcador de tumor amplio, usando su ligando fisiológico, LFA-1. El inventor ha construido un panel de CAR variantes de afinidad que comprenden el dominio I humano. En más detalle, el inventor ha construido dominios I que comprenden los aminoácidos 130-310 de la ID. DE SEC. N°1 con una mutación de F292A, F292S, L289G, F265S o F292G, y la unión ICAM-1 a una afinidad entre aproximadamente 119 nM y aproximadamente 20 μ M de Kd.
- 10 Por tanto, la presente invención proporciona CAR específicos de ICAM con una amplia aplicabilidad antitumoral. Las células T CAR que comprenden el dominio I que tiene afinidad por afinidad micromolar ICAM-1 tienen una eficacia y seguridad mejoradas con respecto a los CAR convencionales, ya que son capaces de lisar células que sobreexpresan antígenos diana mientras se reducen las células normales con densidades mucho más bajas.
- 15 La presente invención se refiere a una proteína químérica de fusión del receptor de antígeno que comprende desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal: (i) un dominio I humano de la subunidad aL del antígeno asociado a la función linfocítica-1, (ii) un dominio transmembrana, (iii) al menos un dominio coestimulador y (iv) un dominio activador, en donde el dominio I comprende los aminoácidos 130-310 de la ID. DE SEC. N°1 con una mutación de F292A, F292S, L289G, F265S o F292G.
- 20 El CAR de la presente invención comprende (i) un dominio I humano que se une específicamente a ICAM-1, es decir, en el que el dominio I de la presente invención comprende los aminoácidos 130-310 de ID. DE SEC. N°1 con una mutación de F292A, F292S, L289G, F265S o F292G. El dominio I específico de ICAM-1 puede construirse utilizando el dominio I derivado de LFA-1 (figuras 1A y 1B). Diversas mutaciones puntuales activadoras en el dominio I se localizan fuera de la interfaz de unión que incluye una región conocida como sitio de adhesión dependiente de iones metálicos (MIDAS) (figura 1B). A este respecto, se menciona generalmente que los mutantes que contienen una elevación escalonada de la afinidad del dominio I a ICAM-1 de 1 mM a 1 nM pueden obtenerse mediante el cribado de una biblioteca de mutantes por su mayor unión a la superficie recubierta de ICAM-1, perlas o células. Por ejemplo, se pueden aislar diferentes mutantes de afinidad usando un sistema de visualización de levaduras (véase Jin y col.²⁷). La afinidad se mide en primer lugar por resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, Biacore) para evaluar la afinidad de unión 1:1 entre el dominio I e ICAM-1. La afinidad de ICAM-1 a CAR expresado en células puede medirse por citometría de flujo y usar la ecuación de isoterma de Langmuir.
- 25 30 Del mismo modo, se puede realizar un análisis de Scatchard para estimar la afinidad CAR midiendo las cantidades de ligando libre y ligando a la superficie celular (en este caso, ICAM-1 marcado con radio o fluorescencia).

La tabla 1 muestra las afinidades medidas de los dominios I de LFA-1 de tipo natural y mutantes a ICAM-1, donde la presente invención, sin embargo, se refiere específicamente a los dominios I que comprenden los aminoácidos 130-310 de ID. DE SEC. N°1 con una mutación de F292A, F292S, L289G, F265S o F292G. Una mayoría de las mutaciones son las cadenas laterales voluminosas que cambian (F, L, I) en más hidrófilos (A, S, T), interrumpiendo así la estructura de la conformación más compacta y de dominio I de baja afinidad. Por ejemplo, la sustitución de Phe-292 ubicada en la hélice α 7 C-terminal con Ala (F292A) y Gly (F292G) proporciona las afinidades (K D) de ~20 μ M y 0,1 μ M, respectivamente (tabla 1). La combinación de F292G con otra mutación de activación comparable en Phe-265 (F265S/F292G), que, sin embargo, no representa una realización de la presente invención, proporciona una afinidad de 6 nM, aproximadamente 200.000 veces mayor que el dominio I de tipo natural (WT) (KD = 1,5 mM) (figura 1C). Para bloquear la hélice α 7 C-terminal de F265S/F292G en la posición abierta (figura 1A), Gly-311 puede reemplazarse con Cys (G311C) en el mutante F265S/F292G (F265S/F292G/G311C, triple mutante o TM) para formar un enlace disulfuro con la Cys-125 de forma natural no apareada (tabla 1). Por tanto, las afinidades monovalentes de las variantes individuales del dominio I por ICAM-1 pueden diseñarse para abarcar aproximadamente seis órdenes de magnitud (KD ~1 nM a 1 mM), medidas por resonancia de plasmón superficial (SPR) o estimadas por citometría de flujo (figura 1C, tabla 1). Dicho triple mutante, sin embargo, no representa también una realización de la presente invención porque la presente invención se refiere específicamente a dominios I que comprenden los aminoácidos 130-310 de ID. DE SEC. N°1 con una mutación de F292A, F292S, L289G, F265S o F292G.

A este respecto, sin embargo, se menciona en general que los mutantes que tienen otras mutaciones y tienen afinidades a ICAM-1 entre 1 mM y 1 nM pueden fabricarse, probarse y seleccionarse según métodos conocidos por un experto.

Tabla 1

Nombre	Secuencia de ID. DE SEC. N°:1	Afinidad
Tipo natural (WT)	G128-G311	1,5 mM*
I288N	G128-G311	202 μ M**
I309T	G128-G311	127 μ M**

L295A	G128-G311	37 μ M**
F292A	G128-G311	20 μ M*
F292S	G128-G311	1,24 μ M**
L289G	G128-G311	196 nM**
F292G	G128-G311	119 nM*
F265S	G128-G311	145 nM*
F265S/F292G (DM)	G128-G311	6 nM *
F265S/F292G/G311C (TM)	E124-S313	~1 nM*
R6.5	scFv	10 nM***

* Mediciones de SPR; ** Los valores estimados de intensidad de fluorescencia promedio (MFI) de la citometría de flujo de la unión de ICAM-1-Fc a las células de levadura que expresan variantes de dominio I⁵. La ecuación usada fue $K_d (M) = 0,00175 \cdot \exp (-0,1542 \cdot MFI)$; *** Estimado a partir del anticuerpo R6.5 titulado que se une a las células HeLa³⁴.

En resumen, el dominio I de la presente invención comprende específicamente los aminoácidos 130-310 de la ID. DE SEC. N°:1 con una mutación de F292A, F292S, L289G, F265S o F292G. Por tanto, el dominio I de la presente invención se une a ICAM-1 a una afinidad entre aproximadamente 119 nM y aproximadamente 20 μ M de Kd.

5 Sin embargo, cabe señalar en general que los receptores antigenéticos quiméricos dirigidos a ICAM-1 pueden comprender un dominio I que sea un dominio I humano de tipo natural, un mutante del dominio I humano de tipo salvaje que tenga de 1 a 3 mutaciones de aminoácidos, o una secuencia que tenga al menos un 95 %, o al menos un 96 % de identidad, o al menos un 97 % de identidad, o al menos un 98 % de identidad, o al menos un 99 % de identidad con la secuencia del dominio I de tipo natural o del mutante, que tenga una afinidad de unión a ICAM-1 humana de 1 mM o superior. Después, el mutante puede tener una o más mutaciones en el residuo de aminoácido 265, 288, 289, 292, 295, 309 o 311 del dominio I de tipo natural. Por ejemplo, el mutante puede tener una o más mutaciones de I288N, I309T, L295A, F292A, F292S, L289G, F292G, F265S, F265S/F292G, o F265S/F292G/G311C, del dominio I de tipo natural. Los dominios I de la presente invención, sin embargo, comprenden específicamente los aminoácidos 130-310 de la ID. DE SEC. N°:1 con una mutación de F292A, F292S, L289G, F265S o F292G.

10 Sin embargo, en una realización que no está cubierta por la presente invención, la combinación de dos mutaciones de dominio I produce un mutante con una mayor afinidad que la de cada mutante original. Por ejemplo, la combinación de dos mutantes que tienen cada uno aproximadamente 100 μ M de Kd produce típicamente un mutante que tiene un intervalo de Kd de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 μ M. F292G es una mutación puntual muy potente; combinar F292G con otras mutaciones aumenta la afinidad del dominio I por ICAM-1 para más fuerte que la Kd 100 nM. La numeración anterior de los restos de aminoácidos es en referencia a la secuencia de aminoácidos madura de la ID. DE SEC. N.º: 1, y el número de residuo 1 corresponde al residuo de aminoácido 26 del número de acceso de GenBank NP_002200.

15 El dominio I de la presente invención se une a ICAM-1 con una afinidad entre aproximadamente 119 nM y aproximadamente 20 μ M Kd, es decir, la presente invención se refiere específicamente a un dominio I que comprende los aminoácidos 130-310 de ID. DE SEC. N°:1 con una mutación de F292A, F292S, L289G, F265S o F292G, en el que se prefiere una mutación de F292A, F265S o F292G.

20 25 En general, un CAR puede comprender dominios I que se unen a ICAM-1 con una afinidad entre 1 mM a 1 nM Kd, preferiblemente 1-200 μ M Kd o 1-20 μ M Kd, en donde el CAR de la presente invención, sin embargo, comprende específicamente el dominio I que se une a ICAM-1 con una afinidad entre aproximadamente 119 nM a aproximadamente 20 μ M Kd. La CAR puede comprender dominios I que se unen a ICAM-1 con una afinidad entre aproximadamente 120 nM y aproximadamente 1 nM Kd, por ejemplo, F292G, F265S/F292G y F265S/F292G/G311C (tabla 1). El CAR puede comprender dominios I que se unen a ICAM-1 con una afinidad entre aproximadamente 200 μ M y aproximadamente 20 μ M de Kd, por ejemplo, I288N, 1309T, L295A y F292A. El CAR puede comprender dominios I que se unen a ICAM-1 con una afinidad entre aproximadamente 1 μ M y aproximadamente 100 μ M de Kd, por ejemplo, L295A, F292A y F292S (tabla 1). El CAR puede comprender dominios I que se unen a ICAM-1 a una afinidad entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 200 μ M de Kd, por ejemplo, dominios de tipo natural e I288N o I que se unen a ICAM-1 a una afinidad entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 100 μ M de Kd, por ejemplo, de tipo natural, I288N e I309T.

Las afinidades mencionadas anteriormente se refieren a la interacción entre el dominio I y ICAM-1 en disolución.

Una ventaja de usar el dominio I humano en la construcción de CAR es que el dominio I humano se une a la ICAM-1 murina con una afinidad comparable a la de la ICAM-1 humana (2 nM frente a 6 nM respectivamente). La reactividad cruzada con su homólogo murino permite examinar la toxicidad de las células T CAR de dominio I en el objetivo y fuera del tumor al mismo tiempo que la eficacia en el objetivo y dentro del tumor en modelos preclínicos de ratón con xenoinjertos tumorales humanos. Esta es una ventaja del dominio I humano para predecir la toxicidad clínica en un modelo preclínico. En comparación, el scFv R6.5 (derivado del clon de hibridoma de ratón, R6.533) tiene una Kd de 10 nM para la ICAM-1 humana (tabla 1) pero no presenta reacción cruzada con la ICAM-1 murina.

El CAR de la presente invención comprende (ii) un dominio transmembrana que abarca la membrana. El dominio transmembrana puede derivarse de un polipéptido natural, o puede diseñarse artificialmente. El dominio transmembrana derivado de un polipéptido natural puede obtenerse a partir de cualquier proteína transmembrana o unión a membrana. Por ejemplo, puede utilizarse un dominio transmembrana de un receptor de células T de cadena α o β , una cadena zeta de CD3, CD28, CD3-épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154 o un GITR. El dominio transmembrana diseñado artificialmente es un polipéptido compuesto principalmente por residuos hidrófobos como la leucina y la valina. En realizaciones preferidas, el dominio transmembrana se deriva de CD28 o CD8, que proporcionan una buena estabilidad al receptor.

El CAR de la presente invención comprende (iii) uno o más dominios coestimuladores seleccionados del grupo que consiste en CD28 humano, 4-1BB (CD137), ICOS-1, CD27, OX 40 (CD137), DAP10, y GITR (AITR). En una realización, el CAR comprende dos dominios coestimuladores de CD28 y 4-1BB.

El endodomino (el dominio de activación) es la parte de transmisión de señal del CAR. Despues del reconocimiento del antígeno, los receptores se agrupan y una señal se transmite a la célula. El componente de endodomino másutilizado es el de CD3-zeta (CD3 Z o CD3 ζ), que contiene 3 ITAM. Esto transmite una señal de activación a la célula T despues de que el antígeno se une. Es posible que CD3-zeta no proporcione una señal de activación totalmente competente y que se necesite una señalización coestimuladora adicional. Por ejemplo, uno o más dominios coestimuladores pueden utilizarse con CD3-Zeta para transmitir una señal proliferativa/de supervivencia.

El CAR de la presente invención puede comprender un péptido señal N-terminal al dominio I de modo que cuando el CAR se expresa dentro de una célula, como una célula T, la proteína naciente se dirige al retículo endoplásmico y posteriormente a la superficie celular, donde se expresa. El núcleo del péptido señal puede contener un largo tramo de aminoácidos hidrófobos con tendencia a formar una hélice alfa simple. El péptido señal puede comenzar con un corto tramo de aminoácidos cargados positivamente, lo que ayuda a reforzar la topología adecuada del polipéptido durante la translocación.

En el extremo del péptido señal, típicamente hay un tramo de aminoácidos que se reconoce y escinde por peptidasa señal. La peptidasa señal puede escindirse durante o después de la translocación para generar un péptido señal libre y una proteína madura. A continuación, los péptidos señal libres son digeridos por proteasas específicas. A modo de ejemplo, el péptido señal puede derivar de CD8 o GM-CSF humanos, o de una variante de los mismos que tenga 1 o 2 mutaciones aminoacídicas, siempre que el péptido señal siga funcionando para provocar la expresión del CAR en la superficie celular.

El CAR de la presente invención puede comprender una secuencia espaciadora como bisagra para conectar el dominio I con el dominio transmembrana y separar espacialmente el dominio de unión a antígeno del endodomino. Un espaciador flexible permite que el dominio de unión se oriente en diferentes direcciones para permitir su unión a un antígeno tumoral. La secuencia espaciadora puede comprender, por ejemplo, una región Fc IgG1, una bisagra IgG1 o un pedúnculo CD8, o una combinación de los mismos. Se prefiere un tallo humano o un tallo de CD8.

La presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica el CAR descrito anteriormente. El ácido nucleico que codifica el CAR puede prepararse a partir de una secuencia de aminoácidos del CAR especificado mediante un método convencional. Puede obtenerse una secuencia base que codifique una secuencia de aminoácidos a partir de los mencionados NCBI RefSeq ID o números de registro de GenBank para una secuencia de aminoácidos de cada dominio, y el ácido nucleico de la presente invención puede prepararse utilizando un procedimiento biológico molecular y/o químico convencional. Por ejemplo, basándose en la secuencia de bases, puede sintetizarse un ácido nucleico, y el ácido nucleico de la presente invención puede prepararse combinando fragmentos de ADN que se obtienen de una biblioteca de ADNc mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El ácido nucleico que codifica el CAR de la presente invención puede insertarse en un vector, y el vector puede introducirse en una célula. Por ejemplo, puede usarse un vector vírico como un vector retrovírico (incluidos un vector oncoretrovírico, un vector lentivirus y un vector pseudotípico), un vector adenovírico, un vector de virus adenoasociado (AAV), un vector de virus simio, un vector de virus vaccinia o un vector de virus Sendai, un vector de virus de Epstein-Barr (EBV) y un vector de VHS. Como vector vírico, se usa preferentemente un vector viral que carezca de capacidad de replicación para no autorreplicarse en una célula infectada.

Por ejemplo, cuando se usa un vector retrovírico, el proceso de la presente invención puede llevarse a cabo seleccionando una célula de empaquetamiento adecuada basada en una secuencia LTR y una secuencia de señal de empaquetamiento que posea el vector y preparando una partícula retrovírica usando la célula de empaquetamiento. Los ejemplos de la célula de empaquetamiento incluyen PG13 (ATCC CRL-10686), PA317 (ATCC CRL-9078), GP+E-86 y GP+envAm-12 y Psi-Crip.

5 También puede prepararse una partícula de retrovirus usando una célula 293 o una célula 293T que tenga una alta eficiencia de transfección. Muchas empresas comercializan muchos tipos de vectores retrovirales producidos a partir de retrovirus y células de empaquetado que pueden usarse para empaquetar los vectores retrovirales.

10 La presente invención proporciona células T o células asesinas naturales (células NK) modificadas para expresar el CAR como se ha descrito anteriormente. Las células CAR-T o CAR-NK de la presente invención se unen a ICAM-1 a través del dominio I de CAR, con lo que se transmite una señal a la célula y, como resultado, ésta se activa. La activación de la célula que expresa el CAR varía en función del tipo de célula huésped y de un dominio intracelular del CAR, y puede confirmarse basándose, por ejemplo, en la liberación de una citocina, la mejora de una tasa de proliferación celular, el cambio en una molécula de superficie celular, la muerte de células diana o similares como índice.

15 Las células T o NK modificadas para expresar el dominio I-CAR pueden utilizarse como agente terapéutico para una enfermedad. El agente terapéutico comprende las células T que expresan el dominio I-CAR como principio activo, y puede comprender además un excipiente adecuado. Ejemplos del excipiente incluyen excipientes farmacéuticamente aceptables conocidos por un experto en la técnica.

20 La presente invención proporciona además un método de terapia celular adoptiva para tratar el cáncer. El método comprende las etapas de: administrar las células CAR-T o las células CAR-NK de la presente invención a un sujeto que padece cáncer, en el que las células cancerosas del sujeto sobreexpresan ICAM-1, y las células CAR-T o las células CAR-NK se unen a las células cancerosas para destruir las células cancerosas. "Sobreexpresar", tal como se usa en el presente documento, se refiere a que las células cancerosas tienen una expresión superficial de ICAM-1 de al menos 10^5 moléculas por célula. En una realización, el CAR comprende un dominio I que tiene una afinidad con ICAM-1 entre aproximadamente 1 y aproximadamente 1000 μM , preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 200 μM , o entre 25 aproximadamente 1 y aproximadamente 20 μM . Los cánceres adecuados para ser tratados por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cáncer de tiroides, cáncer gástrico, cáncer pancreático y cáncer de mama.

30 Mediante la investigación funcional de afinidades de CAR que se extiende paso a paso a través de un rango de 10^6 veces, simultáneamente con células diana con niveles variables de expresión de antígeno, el inventor examinó sistemáticamente la influencia de la afinidad de CAR y la densidad de antígeno en la eficacia de las células T *in vitro* e *in vivo*. El estado de activación de las células T *in vitro*, medido por CD25, la liberación de citocinas y la citotoxicidad, dependía de la afinidad y la densidad del antígeno diana, lo que resultaba en una activación más potente de las células T y la destrucción de la diana con el aumento de la afinidad del CAR y la densidad del antígeno. El umbral de activación de las células T CAR de afinidad nanomolar (TM, F292G) dependía menos de la densidad del antígeno en comparación con las células T CAR de afinidad micromolar (F292A), reaccionando a una densidad de antígeno tan baja como 10^4 moléculas/célula. Por el contrario, las 35 células T CAR F292A perdieron rápidamente la capacidad de lisar células que expresaban antígenos diana por debajo de 10^5 moléculas/célula. Los linfocitos T CAR de afinidad milimolar (tipo ancho, WT) fueron en gran medida poco reactivos a las células diana con niveles de antígeno bajos a moderados, requiriendo una densidad de antígeno umbral de 10^6 moléculas/célula para que se produjera una activación detectable, la liberación de citocinas y la lisis de la diana.

40 La tabla 2 muestra una gama de afinidades deseadas de células T CAR con dominio I a ICAM-1, para células diana con densidad de antígeno ICAM-1 especificada.

Tabla 2.

Densidad I CAM-1 (moléculas/células)	Afinidad de dominio I adecuada
$< 10^4$	aproximadamente 120 nM-1 nM (por ejemplo, TM, F292G)
$10^4 - 10^5$	aproximadamente 20 μM -120 nM (por ejemplo, F292S, F265S)
$10^5 - 10^6$	aproximadamente 200 μM -20 μM (por ejemplo, F292A)
$\geq 10^6$	aproximadamente 1,5 mM-200 μM (por ejemplo, WT)

45 La armonía cuantitativa entre la afinidad de los CAR y la potencia antitumoral *in vitro* es discordante con las observaciones cuantitativas *in vivo*, según las cuales las células CAR-T o CAR-NK de afinidad micromolar (1 - 200 μM o 1 - 20 μM) son superiores a las células CAR-T o CAR-NK de afinidad superior, medidas por la tasa de expansión en el lugar del tumor, la tasa de erradicación tumoral, la frecuencia de recaída tumoral y los niveles de toxicidad en el objetivo y fuera del tumor.

La capacidad de las células CAR-T de dominio I o las células CAR-NK de reaccionar de forma cruzada con la ICAM-1 murina permite una evaluación rigurosa y simultánea de la eficacia de las células CAR-T o CAR-NK contra las células tumorales humanas y la toxicidad en la diana, fuera del tumor, contra la ICAM-1 murina en los tejidos sanos. Mediante la expresión simultánea de un gen informador, el receptor humano de somatostatina 2 (SSTR2), y de CAR de dominio I en células T, seguida de imágenes de tomografía por emisión de positrones (PET) longitudinales, se puede lograr un mapeo espaciotemporal *in vivo* de células T transferidas adoptivamente.

El inicio de la toxicidad parece depender de la afinidad de las CAR y de la carga tumoral, como demuestran las muertes uniformes en ratones tratados con las células CAR T de mayor afinidad (TM), la mayor tasa de toxicidad observada en ratones tratados con CAR F292G con mayor carga tumoral, y la ausencia de toxicidad detectable tras el tratamiento con células CAR T F292A de afinidad micromolar.

Los CAR que comprenden mutantes de alta afinidad (alrededor de 120 nM-1 nM) tienen una alta potencia y son capaces de unirse a células T con baja densidad ICAM de menos de 10^4 por célula.

Los CAR que poseen afinidades en el intervalo micromolar (por ejemplo, de aproximadamente 1 - 200 μ M de Kd) minimizan la toxicidad fuera del tumor contra antígenos expresados basalmente en tejidos normales, y también aumentan el índice terapéutico, en comparación con los CAR que tienen afinidades en el intervalo nanomolar (por ejemplo, de aproximadamente 1 - 200 nM de Kd). Las células T CAR con afinidades diana en el intervalo micromolar pueden evitar dirigirse a tejidos sanos con una expresión basal del antígeno y, al mismo tiempo, mostrar una mayor potencia y eficacia a largo plazo contra tejidos tumorales con una alta expresión de la diana. El CAR de afinidad micromolar (tal como el dominio F292A-I) permite a las células T descuidar los tejidos que expresan menos de 10^5 moléculas/célula, un umbral que los tumores anaplásicos de tiroides sobrepasan a los tejidos sanos, de forma típica no. El acoplamiento del antígeno diana por células T CAR de afinidad nanomolar (por ejemplo, TM, F292G y R6.5 CAR) puede dar lugar a una tasa de desactivación anormalmente lenta, desviándose de la naturaleza transitoria y dinámica de las interacciones que se encuentran de forma nativa entre los TCR y los pMHC⁴⁸. Las interacciones de alta afinidad y avidez por CAR pueden reducir la propensión de las células T a la muerte en serie, causando potencialmente agotamiento o mayor susceptibilidad a la muerte celular inducida por activación⁴⁹. Aunque las células T CAR con afinidad nanomolar a ICAM-1 pueden funcionar, es posible que su funcionamiento no sea óptimo y que sean más propensas al agotamiento y a la liberación excesiva de citocinas, lo que en última instancia facilitaría la toxicidad fuera del tumor o la recaída tumoral.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención. Estos ejemplos pretenden ser meramente ilustrativos de la presente invención y no deben interpretarse como limitativos.

30 Ejemplos

Materiales y métodos

Ejemplo 1. Líneas celulares y linfocitos humanos primarios

Las células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HMEC-1) se obtuvieron del Centro para el Control de Enfermedades y se cultivaron en medio MCDB 131 (Invitrogen) suplementado con suero bovino fetal (FBS, Atlanta Biologicals) al 10 % (v/v), dipéptido de glutamina fetal 10 mM (Gibco), 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina (Pen-strep), de 1 pg/ml de hidrocortisol (MP Biomedicals) y de 10 ng/ml de factores de crecimiento epidérmico humano recombinante (Invitrogen). Se mantuvieron células endoteliales microvasculares cerebrales de ratón (bEnd.3, ATCC) en medio Eagle modificado con Dulbecco avanzado (ADMEM, Invitrogen) complementado con L- glutamina 4 mM, 100 unidades/ml de Pen-strep y FBS al 10 %. Las células HeLa (ATCC) se cultivaron en ADMEM que contenía FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de Pen-strep. Se cultivaron células 8505C (DSMZ) en medio RPMI-1640 (Invitrogen) que contenía FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de Pen-strep. Las células HMGB1, bEnd.3, HeLa y 8505C se transdujeron con lentivirus que codifica Luciferasa de Luciérnaga-F2A-GFP (Biosettia) y se clasificaron en base a fluorescencia.

45 La sangre periférica humana se obtuvo de donantes voluntarios sanos mediante venopunción. Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron usando Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) y se cultivaron en Optimizer CTS T-cell Expansion SFM (Thermo) complementado con un 5 % de suero AB humano (Sigma), 2 mM de dipéptido L-alanil-L-glutamina y 30 UI/ml de IL-2 humana (Cell Sciences) (medio de cultivo de células T). Las células no adherentes se retiraron a las 24 horas y se enriquecieron para células T con el expansor de células T Dynabeads CD3/CD28 (Thermo) en una razón de 2:1 microesferas por célula T. A continuación, las células T unidas con Dynabead se cultivaron en medios que contenían IL-2 a una densidad de 1×10^6 células/ml. Todas las células se incubaron a 37 °C en un incubador humidificado con un 5 % de CO₂.

Ejemplo 2. Construcción del vector CAR de dominio I

Las secuencias genéticas que codifican los dominios LFA-1 I de afinidades variables a ICAM-1 se derivaron de un estudio anterior²⁷. Se fusionaron variantes de dominio I en el extremo C-terminal directamente con la bisagra de CD8, el dominio transmembrana de CD28 y las porciones intracelulares de la arquitectura CAR de 3^a generación que incorporan los dominios citoplasmáticos de CD28, CD137 y CD3ζ. A continuación, los insertos CAR completos se subclonaron en una estructura principal pLenti²⁹. Se unió un gen informador para la obtención de imágenes de células T CAR, SSTR2, al dominio I en el extremo N utilizando una secuencia de "omisión de ribosomas" teschovirus porcino-1 2A (P2A) para garantizar una producción comparable de CAR y SSTR2 a partir del mismo ARNm.

Ejemplo 3. Producción de lentivirus y transducción de células T

Los lentivirus se produjeron transfectando transitoriamente células HEK 293T con fosfato cálcico. Brevemente, se mezclaron 10 µg del gen de transferencia, 7,5 µg de pCMV-dR8.2 (Addgene) y 5 µg de pCMV-VSVG (Addgene) y se incubaron con CaCl₂ 2 M seguido de 2x HBSS. Las disoluciones resultantes se añadieron gota a gota a placas de cultivo celular de 10 cm² sembradas con 3,2 × 10⁶ células HEK 293T en 10 ml de DMEM 24 h antes. Los medios de transfección se sustituyeron a las 6 h. Los medios que contenían lentivirus se recogieron a las 48 y 72 h de la transfección, se filtraron a través de filtros de 0,45 µm y se concentraron mediante ultracentrifugación a 75.000x g durante 2 h a 4 °C. A continuación, los lentivirus se resuspendieron en medios que contenían suero y se congelaron a -80 °C. Las células T humanas se transdujeron 24-72 h después de la activación con Dynabeads anti-CD3/CD28 mediante spinfección (1.000 g durante 1 h a 32 °C) o mediante incubación durante una noche con lentivirus. Las células T se transdujeron una vez más 24 h después de la primera transducción. Durante y después de las transducciones, los medios que contenían IL-2 se sustituyeron por medios que contenían IL-7 humana (10 ng/ml) e IL-15 (5 ng/ml) (Peprotech). Las células T Jurkat se transdujeron mediante una sola incubación durante la noche con lentivirus.

Ejemplo 4. Ensayo de destrucción de células diana in vitro

Se cultivaron conjuntamente 2 × 10⁵ células diana (HMEC-1, bEnd.3, HeLa y 8505C) transducidas de forma estable para expresar GFP y luciferasa de luciérnaga con células T CAR de dominio I o no transducidas en razones variables de efecto con respecto a diana (E:T). En determinadas condiciones, se interrumpió el gen ICAM-1 en las células 8505C usando CRISPR/Cas9 (Santa Cruz, #sc-400098; denominado como 8505C /-ICAM-1) o, alternativamente, las células 8505C se expusieron a 1 µg/ml de lipopolisacárido (LPS *Escherichia coli* O26:B6, Sigma) durante 12 h para inducir la sobreexpresión de ICAM-1 (denominada 8505C/LPS). Los cocultivos se realizaron en medio de cultivo de células T que contenía 150 µg/ml de D-Luciferina (Gold Biotechnology) y sin suplemento de citocinas. La luminiscencia se midió usando un lector de placas (TECAN infinito M1000 PRO) con lecturas en cada condición de E:T normalizada a los controles de células T no transducidas:controles de cocultivo diana.

Ejemplo 5. Modelo de ratón 8505C, formación de imágenes tumorales de cuerpo completo y análisis de citocinas en suero

Se inyectaron 7,5 × 10⁵ células 8505C en ratones NSG a través de la vena de la cola. Se inyectaron 1-3 × 10⁶ células T a través de la vena de la cola 8-10 días después de la inyección de células tumorales. Se eligió el tiempo de inyección en base a estudios previos con células T CAR R6.5 que demostraron la eliminación tumoral usando dosis de CAR similares a hasta 10 días después del xenoinjerto²⁹. La formación de imágenes de luminiscencia de xenoinjertos tumorales en ratones vivos se realizó usando un generador de imágenes óptico de cuerpo completo (In-Vivo Extree, Bruker). Los ratones se anestesieron con isoflurano al 2 % en 2 l/min de O₂. La carga tumoral se cuantificó mediante la integración de luminiscencia sobre la cavidad torácica y todo el cuerpo del ratón. Para el análisis de citocinas en suero, se recogieron 50-100 µl de sangre a través de la vena de la cola en tubos Eppendorf en hielo. El plasma se aisló inmediatamente después de eliminar el sedimento celular mediante centrifugación a 2.000 g durante 10 min a 4 °C, y se almacenó a -80 °C. Las citocinas humanas (GM-CSF, IL-2, IL-6, IFN-γ, TNF-α, CXCL10) se midieron por duplicado mediante el uso de Bio-Plex MAGPIX (Bio Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 6. Análisis celular ex vivo

Se resecaron xenoinjertos tumorales de ratones en puntos de tiempo apropiados. Los tumores resecados se cortaron en dados y se lavaron con coladores celulares de 80 µm para obtener suspensiones de células individuales. Los glóbulos rojos se lisaron mediante incubación con tampón de lisis de RBC 1 x (eBiosciences). Las células restantes se lavaron, se volvieron a suspender en 1x HBSS con un 2 % de suero de cabra normal y se bloquearon con IgG de ratón a 2 µg/ml durante 10 minutos. A continuación se realizó la tinción con 1 µg/ml de yoduro de propidio (Invitrogen) en combinación con 2 µg/ml de anti-CD3 humano de ratón-Alexa Fluor 647 (Biolegend) o 2 µg/ml de anti-c-myc de conejo-Alexa Fluor 647 (Biolegend). Las células resultantes se adquirieron en un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter). Las compuertas de citometría de flujo iniciales se determinaron en base a la activación de células vivas (yoduro de propidio negativo).

Ejemplo 7. Cuantificación de ICAM-1 y de expresión de CAR

La expresión de ICAM-1 en diversas líneas celulares se determinó mediante el uso de un anticuerpo monoclonal R6.5 de ratón antihumano (10 µg/ml) obtenido del hibridoma (ATCC). La expresión del dominio I CAR en células T se

detectó utilizando 2 µg/ml de conejo anti-c-myc-Alexa Fluor 647 (Biolegend). Se incubaron variantes de células T Jurkat de dominio I con 10 µg/ml de ICAM-1 humana recombinante fusionada con Fey humana (R&D Systems). A continuación, se lavaron las células y se resuspendieron en 1 µg/ml de PE antihumano de conejo (Santa Cruz Biotechnology) antes del análisis por citometría de flujo.

5 **Ejemplo 8. Medición in vitro de IFN-γ**

Las células diana se lavaron y se suspendieron a 1×10^6 células/ml en medio de cultivo de células T sin citocinas. Se añadieron 100 µl de cada célula diana por triplicado a una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Corning). Las células T resuspendidas a 5×10^6 células/ml en medio de cultivo de células T se combinaron con las células diana en los pocillos apropiados. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 - 48 h. Tras la incubación, se recogieron 10 sobrenadantes para ELISA para detectar IFN-γ (Biolegend).

Ejemplo 9. Tinción de CD25 y CD69

Las células Jurkat modificadas con CAR de dominio I se cocultivaron con células diana en una razón de efector con respecto a diana de 1:1 (1×10^5 efectores: 1×10^5 dianas) en una placa de 96 pocillos. La placa se incubó a 37 °C durante 6 h. Después de la incubación, se lavaron las células antes de marcarlas con 2 µg/ml de antialoficocianina CD25 humana (APC; Biolegend) durante 15 30 min en hielo. Después de la incubación, las muestras se lavaron y analizaron por citometría de flujo. Como alternativa a las células que expresan ICAM-1, también se usaron microperlas recubiertas con cantidades conocidas de ICAM-1. Se resuspendieron 1×10^6 microperlas de látex de sulfato (8 µm, ThermoFisher Scientific) en 100 µl de PBS que contenía 20 cantidades indicadas de ICAM-1-Fey recombinante humano o murino (R&D Systems) conjugado con Cy5,5 (Sulfo-Cyanina5,5 NHS éster, Lumisonda) durante la noche a temperatura ambiente con mezcla suave. Las partículas marcadas con proteína se sedimentaron y se resuspendieron en PBS fresco que contenía glicina 0,1 M pH 7,4 durante 1 h, mientras que el sobrenadante se usó para medir la eficacia de adsorción de perlas por fluorescencia (TECAN infinite M1000 PRO).

Después de la saturación de la superficie de la perla con glicina, las perlas se sedimentaron y se resuspendieron en PBS que contenía MgCl2 5 mM. Las células Jurkat modificadas con cada variante de CAR de dominio I se incubaron con perlas de látex unidas a ICAM-1 en una razón de 1:3 (célula:perla) durante la noche a 37 °C. Después, las células se recogieron, 25 se marcaron con 2 µg/ml de CD69-APC humana (Biolegend) para su análisis mediante citometría de flujo.

Ejemplo 10. Ensayo de adhesión de fondo en V

Las placas de 96 pocillos de fondo en V (Corning) se recubrieron con ICAM-1-Fcy murino o humano (10 µg/ml en PBS, pH 7,4) o BSA al 2 % a 4 °C durante la noche. A continuación, las placas se bloquearon con BSA al 2 % durante 30 1 h a 37 °C. Los clones CAR T de dominio I se tiñeron primero con CellTracker Orange según el protocolo del fabricante y luego se añadieron a pocillos recubiertos con ICAM-1 en 50 µl de PBS que contenía 5 mM de MgCl2 y BSA al 1 %. Las placas se centrifugaron inmediatamente a 200 g durante 15 min a temperatura ambiente. Las células no adherentes que se acumularon en el fondo de las placas con fondo en V se cuantificaron mediante un lector de placas de fluorescencia (TECAN infinite M1000 PRO). La unión celular a ICAM-1 se calculó a partir de los valores de intensidad 35 de fluorescencia de las mediciones experimentales (FCAR y FNT) y se normalizó con respecto a la fluorescencia de los pocillos recubiertos únicamente con BSA (FBSA): $100 \times ((FBSA-FCAR)/FBSA)/((FBSA-FNT)/FBSA)$.

Ejemplo 11. Marcaje de $^{18}\text{NOTA-octreotida (NOTAOCT)}$

Se obtuvo NOTAOCT (ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético-octreotida³⁰, calidad para BPF) como un polvo liofilizado 40 1 mg (n.º de cat. 9762, ABX Pharmaceuticals). El contenido del vial de NOTAOCT se diluyó con agua de 18 MW hasta 200 µl (disolución de 5 mg/ml) y se almacenó a 4 °C como disolución madre. Para la quelación de NOTA con flúor-18³¹, se añadieron 5 µl de NOTAOCT a 10 µl de acetato sódico 0,1 M, pH 4, 6 µl de AlCl3 2 mM y 100 µl que contenían ~30 mCi ^{18}F . La disolución se colocó inmediatamente en un Thermomixer (Eppendorf) a 100 °C y se incubó durante 15 minutos, tras lo cual se enfrió hasta temperatura ambiente y se diluyó en 15 ml de ddH2O. Se regeneró una columna Sep-Pak light C18 en 3 ml de etanol al 100 % y se lavó dos veces en 5 ml de ddH2O con un caudal observado de 10 gotas por minuto. A continuación se cargó NOTAOCT 45 en la columna de Sep-Pak, que después se lavó en 15 ml de agua de 18 MW para eliminar cualquier resto restante ^{18}F . El NOTAOCT atrapado se eluyó de la columna utilizando 300 µl de etanol y se diluyó a 1,5 ml con PBS para inyección, proporcionando el producto final en disolución inyectable isotónica de etanol al ~15 %. El eluyente se pasó a través de un filtro de 0,2 µm. La pureza del producto final se comprobó mediante HPLC de fase inversa.

Ejemplo 12. Formación de imágenes PET/CT

50 Las imágenes de CT registradas se adquirieron usando un escáner micro-PET/CT (Inveon, Siemens) a 1-2 h después de la inyección de NOTAOCT. Los datos de proyección se adquirieron en una geometría de haz cónico con pasos de aproximadamente 1 s en incrementos angulares de 1 grado. Se adquirieron al menos 10 millones de eventos de coincidencia para PET por estudio utilizando una ventana de energía de 250 a 750 keV y una ventana de tiempo de 6 ns. Un tubo de referencia que contiene 100 µl de una dosis equivalente al 10 % de ID/cm3 para la cuantificación de la captación de NOTATOC *in vivo*. Para calcular la captación NOTAOCT en los pulmones de ratón, se dibujaron

elipsoides por separado en los lados izquierdo y derecho de los pulmones para abarcar la mayor parte de su huella. Los valores % de ID/cm^3 , calculados en relación con los recuentos obtenidos en el tubo de referencia, se aproximan a un valor de absorción convencional (SUV 32) dividiendo % de ID/cm^3 entre cuatro, suponiendo una eficacia de inyección del 100 % y 25 g de peso corporal. La visualización y el análisis de las imágenes PET/CT se realizaron con el programa informático AMIDE (<http://amide.sourceforge.net>).

5 Ejemplo 12. Histología

Después de la eutanasia, los pulmones de los ratones se perfundieron por vía traqueal con paraformaldehído al 4 %, y cada uno de los cinco lóbulos se separó tras la fijación y se incrustó en parafina. Los tejidos se cortaron para obtener secciones de 5 μm (Microtome, Leica). Las secciones embebidas en parafina se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) o sólo con hematoxilina para inmunotinción de CD3 y GFP (realizada por HistoWiz, Inc.). El análisis histológico fue realizado por un patólogo experimentado.

10 RESULTADOS

15 Análisis estadístico

Se realizaron ANOVA de un factor, la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett y la prueba de la t de Student no emparejada utilizando Prism (GraphPad) en los datos indicados.

20 Ejemplo 13. Células T CAR específicas de ICAM-1 con una variación escalonada de la afinidad de 10^6 veces

Los constructos de CAR específicos para ICAM-1 se construyeron mediante el uso del dominio I derivado de LFA-1 (figuras 1A-B; tabla 1), según Jin y col27 y la patente estadounidense n.º 8.021.668.

25 Para comprobar si las afinidades del dominio I mutante se correlacionan con las afinidades de los CAR, se transdijeron células T HEK 293T y Jurkat con lentivirus que codificaban CAR de 3^a generación que contenían el dominio I TM, F292G, F292A o WT, y se ensayó su unión a ICAM-1. Se adjuntó una etiqueta myc al extremo N-terminal de cada variante del dominio I para ayudar a la medición de la expresión de CAR (figuras 1D-E). Para evitar la unión de fondo de ICAM-1 a LFA-1 endógeno en células T Jurkat, se estimó la afinidad de CAR para ICAM-1 usando células HEK 293T transducidas con CAR de dominio I. El nivel de unión de la ICAM-1 humana recombinante a las células HEK 293T que expresan el dominio I CAR se correlacionó con las mediciones de afinidad de la solución, mostrando TM la unión más fuerte, seguida de F292G y F292A, y sin unión detectable a WT en comparación con las células T no transducidas (NT) (figura 1F). También se examinaron las afinidades diferenciales de los CAR por la ICAM-1 y la reactividad cruzada con la ICAM-1 murina midiendo la adhesión celular a placas de fondo en V recubiertas con ICAM-1 recombinante humana o murina (figura 1G). Las células Jurkat transducidas con CAR TM y F292G demostraron un mayor nivel de unión a ICAM-1 tanto humana como murina en comparación con las células no transducidas. Sin embargo, a pesar del aumento de la unión de la ICAM-1 recombinante a las células HEK 293T que expresan el CAR F292A en comparación con sus homólogas que expresan el dominio I WT (figura 1F), las células F292A CAR-Jurkat carecían de cualquier unión adicional a la ICAM-1 unida a la placa en comparación con las células que expresan el dominio I NT o WT (figura 1G). En el caso del dominio F265S I, que demostró una unión a ICAM-1 soluble comparable a la de F292G (145 frente a 119 nM, tabla 1), las células T CAR F265S no demostraron ninguna unión adicional a ICAM-1 humana unida a placa, mientras que la unión elevada fue más evidente a ICAM-1 murina. Como se anticipó, las células T transducidas para expresar el CAR R6,5, que es específico para ICAM-1 humano solo, exhibieron una unión elevada a ser humano, pero no a ICAM-1 murino (figura 1G).

40 Ejemplo 14. Influencia de la afinidad CAR y la densidad del antígeno diana en la activación de células T CAR in vitro

45 Se usaron células T Jurkat que expresan CAR de dominio I para examinar el grado en que la activación de células T CAR estaba influenciada por la afinidad de CAR e la densidad de antígeno ICAM-1 en células diana. Las células T Jurkat se incubaron con diversas líneas celulares diana con diferentes concentraciones de ICAM-1 de la superficie ICAM-1 de las líneas celulares diana se estimaron mediante el ensayo primero de los niveles de unión del anticuerpo anti-ICAM-1 a los mismos y comparando estas señales con las obtenidas usando perlas de látex de 8 μm acopladas con cantidades conocidas de anticuerpo R6.5 conjugado con cy5.5 (10^3 - 10^7 anticuerpos por perla). Se usó el nivel de desplazamiento tras la incubación con R6.5 (negro) respecto al no marcado (gris) para estimar la densidad de ICAM-1 en cada línea celular diana indicada.

50 El panel de células diana incluye: HMEC-1 y bEnd.3, que representan, respectivamente, células humanas y de ratón sanas con niveles fisiológicos de ICAM-1 ($\sim 10^4$ moléculas por célula); carcinoma anaplásico de tiroides (8505C) que expresa un nivel intermedio ($\sim 10^5$ por célula); y líneas celulares de cáncer de cuello uterino (HeLa) que expresan un alto nivel de ICAM-1 ($\sim 10^6$ por célula). Para realizar comparaciones adicionales, incluimos 8505C con inactivación del gen ICAM-1 mediada por CRISPR/Cas9 (8505C-ICAM-1) y 8505C tratados con LPS para aumentar la expresión de ICAM-1 (8505C/LPS). En la tabla 3 se resume la densidad del sitio ICAM-1 en las células diana usadas en el presente documento.

Tabla 3.

Células diana	Densidad ICAM-1 (moléculas/célula)
bEND.3	<10 ⁴
HMEC-1	<10 ⁴
8505C	10 ⁵
8505C/LPS	10 ⁵ -10 ⁶
8505C/-ICAM-1	No detectable
HeLa	10 ⁶

5 La activación de las células T CAR tras la interacción con las células diana se examinó midiendo la expresión de CD25 (receptor α de IL-2) y CD69. Se examinó la expresión de CD25 en células T Jurkat CAR (WT, F292A, F292G y TM) tras la coincubación con diferentes líneas celulares diana durante 24 h (n = 3-4). Se indujo CD69 después de la incubación con perlas de látex recubiertas con 106 moléculas de ICAM-1-Fc humanas recombinantes. Se observaron niveles elevados de CD25 en las células T CAR de dominio I WT después de la incubación con 8505C estimuladas con LPS, pero no con otras líneas celulares que expresan niveles más bajos de ICAM-1. Por el contrario, se observó un aumento de la expresión de CD25 cuando las células T CAR TM de alta afinidad se incubaron con células con alta expresión de ICAM-1, así como con células HMEC-1 y bEnd.3 que expresaban niveles basales de ICAM-1. Se detectó un bajo nivel de expresión de CD25 en las células T TM CAR tras la incubación con células diana carentes de expresión de ICAM-1 (8505C/-ICAM-1), probablemente debido a contactos celulares homotípicos mediados por interacciones moleculares entre TM CAR y la expresión basal de ICAM-1 en células Jurkat (~104 moléculas/célula). Las células T que expresan F292G se comportaron de forma similar a las TM, salvo que la expresión de CD25 se aproximó a los niveles de fondo tras la coincubación con 8505C/-ICAM-1. Las células T F292A de afinidad micromolar demostraron una activación selectiva mostrando una elevada expresión de CD25 sólo tras la incubación con células 8505C y 8505C/LPS. Esto indica que se requiere una densidad de antígeno diana umbral de >105 moléculas ICAM-1 por célula para la activación de células T CAR F292A. A diferencia de la activación dependiente de la densidad ICAM-1 de CD25, se observó una mayor expresión de CD69 incluso en ausencia de células diana, con niveles de expresión que se alinearon estrechamente con la afinidad de CAR por ICAM-1, que no mejoró aún más mediante la incubación con perlas de látex recubiertas con ICAM-1. En comparación con CD25, la inducción de CD69 parecía requerir un umbral de menor nivel de densidad de antígeno para la activación, que se proporcionó por interacción homotípica entre las células T CAR.

25 Ejemplo 15. Influencia de la afinidad CAR y la densidad del antígeno diana en la citotoxicidad de células T CAR in vitro

Después de validar la afinidad y la activación dependiente de antígeno de las células T Jurkat modificadas con CAR, se buscó examinar la influencia de la afinidad de CAR y la densidad de antígeno en la activación y citotoxicidad de las células

30 T primarias in vitro. Las células T primarias se transdijeron con los CAR de dominio I T, F292A, F292G y WT, y se añadieron a diversas células diana para determinar su eficacia citotóxica in vitro. En general, hubo una correlación positiva entre la tasa de lisis de la célula diana y la expresión de ICAM-1 (HeLa > 8505C/LPS > 8505C > HMEC-1 > bEND.3) en todas las células CAR T con variante de dominio I (figura 2A). La tasa de destrucción también fue más rápida cuando las células T 35 expresaron CAR que poseían una mayor afinidad por ICAM-1 (TM > F292G > F292A > WT).

40 Para comparar cuantitativamente la eficacia de la destrucción por las células T CAR variantes de afinidad, se usó una curva sigmoidal de pendiente variable (% vivo = 100/[1+10(t-t₅₀ %)* Pendiente]) para encontrar los valores mejor ajustados que describen el tiempo necesario para alcanzar el 50 % de matanza (t₅₀ %) y la pendiente de Hill (FIG. 2B). El tiempo transcurrido hasta la destrucción del 50 % de la diana fue mayor con células T CAR de menor afinidad o menor densidad de antígeno para las mismas células T CAR. La pendiente de Hill, que corresponde a la tasa de destrucción de la diana por las células T CAR, fue mayor al aumentar la afinidad (menor Kd) por las mismas células diana. La pendiente de Hill también fue mayor con el aumento de la densidad del antígeno para las mismas células T CAR. La destrucción de células T CAR de células diana fue específica como lo demuestra la falta de destrucción observada de células 8505C negativas para ICAM-1 por todos los CAR variantes de dominio I excepto el TM. La destrucción baja pero gradual de 8505C/-ICAM-1 por células T TM se debió probablemente a la activación citotóxica causada por contactos celulares homotípicos mediados por la interacción TM con ICAM-1 en células T. La tabla 4 resume el tiempo (horas) hasta la muerte del 50 % determinado ajustando los datos a una curva sigmoidal de pendiente variable.

45 Tabla 4.

CAR T	HMEC	bEND3	8505C/-ICAM-1	8505C	8505C/LPS	HeLa
WT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30,23
F292A	n.d.	n.d.	n.d.	41,55	30,81	18,66
F292G	21,05	16,23	n.d.	27,32	23,98	14,93
TM	13,45	13,03	32,63	17,12	15,05	10,84

Sólo se muestran los valores de mejor ajuste con valores r-cuadrado superiores a 0,85 así indicado como no determinado, n.d.

La tabla 5 muestra los valores de pendiente de Hill determinados ajustando los datos a una curva sigmoidal pendiente variable.

5

Tabla 5.

CAR T	HMEC	bEND3	8505C/-ICAM-1	8505C	8505C/ LPS	HeLa
WT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,09894
F292A	n.d.	n.d.	n.d.	0,04424	0,04976	0,1096
F292G	0,07538	0,05292	n.d.	0,06098	0,05872	0,1059
TM	0,08384	0,05793	0,05493	0,08686	0,08695	0,1099

Sólo se muestran los valores de mejor ajuste con valores r-cuadrado superiores a 0,85 así indicado como no determinado, n.d.

10 La expresión de ICAM-1 en células T primarias puede inducirse después de la activación de células T tal como por incubación con perlas CD3/CD28 ($\sim 10^5$ moléculas/célula). En comparación, las células T CAR WT que poseen afinidad milimolar ($K_d = 1,5$ mM) podrían lisar específicamente las células HeLa sólo, lo que indica una densidad de antígeno umbral de aproximadamente 10^6 moléculas por célula por células T con CAR ~ 1 mM. Es importante destacar que las células T CAR de dominio F292A y WT I ($K_d > 10$ μ M) no fueron reactivos a células de control saludable humanas y murinas, HMGB1 y b.END3 ($\sim 10^4$ por célula; FIG. 2A).

15 La liberación de IFN- γ por las células T CAR alineadas estrechamente con la tasa de muerte celular diana, donde se encontraron niveles crecientes en cocultivos que contenían células T con CAR de mayor afinidad y/o niveles más altos de expresión de antígeno diana (figura 2D). Una excepción a la liberación de IFN- γ dependiente de la densidad del antígeno fue TM y F292G, que mostró cantidades significativas de liberación de IFN- γ (> 1 ng/ml) en ausencia de moléculas diana (8505C/-ICAM-1). Esto se debe de nuevo probablemente a las interacciones homotípicas entre las células T, que también se apoya por la observación de la dificultad con expandir las células T CAR de TM, particularmente cuando el nivel de expresión de CAR fue alto. La liberación de IFN- γ mediante células T con CAR de afinidad micromolar (F292A) fue en proporción a la densidad de ICAM-1 en las células diana, demostrada por la falta de liberación tras la incubación con 8505C/-ICAM-1, y aumentando progresivamente con incubación con HECC-1, 8505C, 8505C/LPS y HeLa en este orden (figura 2D). De acuerdo con la citotoxicidad del dominio I de WT hacia las células HeLa, la liberación de IFN- γ tras la incubación con HeLa fue comparable a los niveles secretados por otros linfocitos T con CAR de mayor afinidad.

Ejemplo 16. Eficacia *in vivo* de las células T con CAR de dominio I sintonizadas por afinidad

30 Se examinó cómo los patrones de citotoxicidad de células T CAR dependientes de afinidad *in vitro* se traduciría en modelos de xenoinjerto tumoral *in vivo*. En tumores sólidos, la eficacia de las células T CAR se ve influenciada por su capacidad para el tráfico a los sitios tumorales, penetrar en serie las células tumorales, y experimentar expansión y contracción de acuerdo con la carga tumoral. En este caso, se xenoinjertaron ratones mediante inyecciones i.v. sistémicas de $0,75 \times 10^6$ 8505C-FLuc⁺GFP⁺ células seguido de tratamiento con $\sim 1 \times 10^6$ células T con CAR de dominio I (WT, F292A, F265S, F292G y TM), SSTR2-R6,5 CAR²⁹, NT (no transducido) T, y no células T a 8-10 días después del xenoinjerto (5-20 % de expresión de CAR). La carga tumoral se evaluó mediante imágenes de luminiscencia de cuerpo completo de la actividad de luciferasa de luciérnaga. Tumores primarios localizados en los pulmones e hígado con focos metastásicos distantes evidentes en todo el cuerpo (figura 3A). Las cohortes que reciben ya sea células T o células T NT succionaron a la carga tumoral dentro de las 3-4 semanas de inoculación del tumor. Los ratones tratados con células T CAR T mostraron reducciones iniciales rápidas en el estallido tumoral; sin embargo, a aproximadamente 7 días después de la inyección de células T, los ratones comenzaron a mostrar síntomas de toxicidad sistémica indicados por letargo y pérdida de peso, dando como resultado la muerte por el día 15 después del tratamiento (figuras 3A-B). Las células T CAR F292G fueron capaces de la eliminación tumoral con un desarrollo de toxicidad inconsistente, que parecía ser parcialmente dependiente de la carga tumoral en el momento del tratamiento con células T CAR. Por ejemplo, ya sea infusiones retardadas de células T CAR F292G (afinidad 119 nM) (día 10) o una mayor carga tumoral en el momento del tratamiento condujo a muertes más frecuentes. Las células T que expresan CAR F265S (K_d 145 nM), eliminaron los tumores sin toxicidad observable. Esto sugiere que una afinidad de CAR del dominio I de ~ 100 nM de K_d define una afinidad umbral aproximada, por encima de la cual el tratamiento con un tratamiento de K_d inferior a 100 nM, tal como 1-10 nM, conduce a una discriminación reducida entre las densidades de antígeno altas y bajas y una mayor probabilidad de toxicidad fuera del tumor en la diana. En consonancia con la limitada o nula destrucción de 8505C por las células T CAR WT *in vitro*, la progresión tumoral *in vivo* no se vio impidiida por el tratamiento de células T CAR WT, de forma similar a las células T NT (figura 3B). Por el contrario, las células T CAR F292A, que mostraron una tasa de destrucción *in vitro* de 8505C mucho más lenta en comparación con sus homólogas de mayor afinidad, lograron rápidas reducciones de la carga tumoral sin toxicidad aparente independientemente del momento del tratamiento (figura 3A-3B). Además, la eficacia *in vivo* del CAR T F292A fue superior a la del CAR R6.5 basado en scFv a pesar de una afinidad $> 1,000$

veces inferior a ICAM-1 (10 nM frente a 20 μ M), como lo demuestra una tasa más rápida de eliminación del tumor y una supresión duradera de la recidiva tumoral (figura 3A).

En general, la eficacia antitumoral de las células T con CAR de dominio I condujo a aumentos estadísticamente significativos en la supervivencia de la cohorte en comparación con ningún ratón tratado con células T o NT (figura 3C). Sin embargo, los ratones tratados con células T CAR incluso sin poca carga tumoral comenzaron a mostrar signos de toxicidad (por ejemplo, pérdida de peso, pérdida de pelaje) que eventualmente condujo a la muerte frecuente ~10 semanas después de las inyecciones de células T. Se sospechó que esto estaba relacionado con la enfermedad injerto contra huésped³⁴ y no con la toxicidad en la diana, fuera del tumor, ya que se observaron toxicidades similares en ratones tratados con células T CAR R6.5 dirigidas exclusivamente a ICAM-1 humana.

10 **Ejemplo 17. Formación de imágenes en tiempo real de la cinética, eficacia y toxicidad de las células T CAR**

Para monitorizar espaciointemporalmente la distribución de las células T en tiempo real mediante PET/TC, se introdujo un gen informador de formación de imágenes, SSTR2, en el vector CAR de dominio I utilizando una secuencia P2A de omisión de ribosomas para garantizar la misma expresión de CAR y del informador en la superficie de las células T (figura 4A). La expresión de SSTR2 permitió la unión y acumulación intracelular de un radiotrazador específico de SSTR2, ¹⁸F-NOTA-Octreotida³⁰, que emite positrones. A continuación, las señales emitidas se detectaron con alta resolución y sin problemas de penetración en los tejidos mediante un escáner micro PET. Mediciones de citometría de flujo de gen indicador SSTR2 y expresión de etiqueta Myc que representa CAR en la superficie de células T humanas primarias. La expresión de SSTR2 y el dominio I marcado con Myc se confirmó mediante tinción con anticuerpos mediante mediciones de citometría de flujo de gen indicador SSTR2 y expresión de etiqueta Myc que representa CAR en la superficie de células T humanas primarias.

20 Los ratones se xenoinjertaron con tumores 8505C como antes, y se trajeron con células T CAR NT o F292A. La formación de imágenes de luminiscencia de cuerpo completo se realizó para estimar la carga tumoral mientras que la formación de imágenes PET/CT se realizó el mismo día para rastrear la distribución de células T CAR (figura 4B). En cada punto de tiempo, se recogió sangre para medir las citocinas humanas para la correlación con la dinámica de las células T. Las imágenes PET/CT en ratones mostraron niveles de fondo esperados en la vesícula biliar, los riñones y la vejiga causados por la excreción por radiotrazador (figura 4B; extremo derecho). En la cohorte de control tratada con NT, se observó un aumento pequeño pero gradual de la captación inespecífica del trazador, que se debió al aumento de la carga tumoral y al aumento asociado de la acumulación de sangre (figura 4B). Por el contrario, se observó una captación específica del trazador en ratones tratados con células T CAR SSTR2-F292A, lo que demuestra las fases de expansión y contracción en los pulmones, con un pico de señal de células T CAR que se produce aproximadamente a los 22 días tras el xenoinjerto, que es 4 días después del pico de carga tumoral (18 días tras el xenoinjerto), y que disminuye gradualmente a niveles de fondo (figuras 4B-4C). Esto demuestra un fenómeno bifásico de expansión y contracción de las células T.

25 El análisis de citocinas del suero obtenido de los ratones tratados demostró un aumento de las concentraciones de IFN- γ , IL-6 y CXCL10 antes del pico de expansión de células T, que también volvieron a los niveles de fondo tras la eliminación del tumor y después de la contracción de la densidad de células T en los pulmones a niveles de fondo (figura 4D).

30 35 Bibliografía

1. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Riviere I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol* 20, 70-75 (2002).
2. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10024-10028 (1989).
3. Hudecek M, y col. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. *Clin Cancer Res* 19, 3153-3164 (2013).
4. Watanabe K, y col. Target antigen density governs the efficacy of anti-CD20-CD28-CD3 zeta chimeric antigen receptor-modified effector CD8+ T cells. *J Immunol* 194, 911-920 (2015).
5. Kochenderfer JN, y col. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with 40 autologous T cells genetically engineered to recognize CD 19. *Blood* 116, 4099-4102 (2010).
6. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *New England Journal of Medicine* 365, 725--733 (2011).
7. Grupp SA, y col. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 368, 1509-1518 (2013).
8. Brentjens RJ, y col. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 5, 177ra138 (2013).
9. Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood* 127, 3321-3330 (2016).
10. Cheever MA, y col. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* 15, 5323-5337 (2009).
11. Kakarla S, Gottschalk S. CAR T cells for solid tumors: armed and ready to go? *Cancer J* 20, 151-155 (2014).
12. Lamers CH, y col. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J Clin Oncol* 24, e20-22 (2006).

13. Parkhurst MR, y col. T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol Ther* 19, 620-626 (2011).
14. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* 18, 843-851 (2010).
- 5 15. Tian S, Maile R, Collins EJ, Frelinger JA. CD8+ T cell activation is governed by TCR-peptide/MHC affinity, not dissociation rate. *J Immunol* 179, 2952-2960 (2007).
- 10 16. Hebeisen M, Allard M, Gannon PO, Schmidt J, Speiser DE, Rufer N. Identifying Individual T Cell Receptors of Optimal Avidity for Tumor Antigens. *Front Immunol* 6, 582 (2015).
17. Zhong S, y col. T-cell receptor affinity and avidity defines antitumor response and autoimmunity in T-cell immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 6973-6978 (2013).
18. Liu X, y col. Affinity-Tuned Erbb2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice. *Cancer Res* 75, 3596-3607 (2015).
19. Caruso HG, y col. Tuning Sensitivity of CAR to EGFR Density Limits Recognition of Normal Tissue While Maintaining Potent Antitumor Activity. *Cancer Res* 75, 3505-3518 (2015).
- 20 20. Arcangeli S, y col. Balance of Anti-CD123 Chimeric Antigen Receptor Binding Affinity and Density for the Targeting of Acute Myeloid Leukemia. *Mol Ther*, (2017).
21. Chmielewski M, Hombach A, Heuser C, Adams GP, Abken H. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. *J Immunol* 173, 7647-7653 (2004).
22. Schmid DA, y col. Evidence for a TCR affinity threshold delimiting maximal CD8 T cell function. *J Immunol* 184, 4936-4946 (2010).
23. Corse E, Gottschalk RA, Krogsgaard M, Allison JP. Attenuated T cell responses to a high-potency ligand in vivo. *PLoS Biol* 8, (2010).
24. Park S, y col. Tumor suppression via paclitaxel-loaded drug carriers that target inflammation marker upregulated in tumor vasculature and macrophages. *Biomaterials* 34, 598-605 (2013).
- 25 25. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137, 245-254 (1986).
26. Shimaoka M, y col. Reversibly locking a protein fold in an active conformation with a disulfide bond: integrin alpha₁ domains with high affinity and antagonist activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6009-6014 (2001).
- 30 27. Jin M, y col. Directed evolution to probe protein allostery and integrin I domains of 200,000-fold higher affinity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 5758-5763 (2006).
28. Wong R, Chen X, Wang Y, Hu X, Jin MM. Visualizing and Quantifying Acute Inflammation Using ICAM-1 Specific Nanoparticles and MRI Quantitative Susceptibility Mapping. *Ann Biomed Eng* 40, 1328-1338 (2011).
- 35 29. Vedvyas Y, y col. Longitudinal PET imaging demonstrates biphasic CAR T cell responses in survivors. *JCI Insight* 1, e90064 (2016).
30. Laverman P, y col. A novel facile method of labeling octreotide with (18)F-fluorine. *J Nucl Med* 51, 454-461 (2010).
31. McBride WJ, y col. A novel method of 18F radiolabeling for PET. *J Nucl Med* 50, 991-998 (2009).
32. Kinahan PE, Fletcher JW. Positron emission tomography-computed tomography standardized uptake values in 40 clinical practice and assessing response to therapy. *Semin Ultrasound CT MR* 31, 496-505 (2010).
33. Leelawattanachai J, Kwon KW, Michael P, Ting R, Kim JY, Jin MM. Side-by-Side Comparison of Commonly Used Biomolecules That Differ in Size and Affinity on Tumor Uptake and Internalization. *PLoS One* 10, e0124440 (2015).
34. Poirot L, y col. Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for "Off-the-Shelf" Adoptive T-cell Immunotherapies. *Cancer Res* 75, 3853-3864 (2015).
- 45 35. Kang S, y col. Virus-mimetic polyplex particles for systemic and inflammation-specific targeted delivery of large genetic contents. *Gene Ther* 20, 1042-1052 (2013).
36. Hinrichs CS, Restifo NP. Reassessing target antigens for adoptive T-cell therapy. *Nat Biotechnol* 31, 999-1008 (2013).
37. Newick K, O'Brien S, Moon E, Albelda SM. CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. *Annu Rev Med* 68, 139-152 (2017).
- 50 38. Ledebur HC, Parks TP. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. *J Biol Chem* 270, 933-943 (1995).
39. Usami Y, y col. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression correlates with oral cancer progression and induces macrophage/cancer cell adhesion. *Int J Cancer* 133, 568-578 (2013).
- 55 40. Roland CL, Harken AH, Sarr MG, Barnett CC, Jr. ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer. *Surgery* 141, 705-707 (2007).
41. Guo P, y col. ICAM-1 as a molecular target for triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 14710-14715 (2014).
- 60 42. Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol* 15, 547-556 (2003).
43. Boissonnas A, Fetler L, Zeelenberg IS, Hugues S, Amigorena S. In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *J Exp Med* 204, 345-356 (2007).
44. Porter BB, Harty JT. The onset of CD8+T-cell contraction is influenced by the peak of Listeria monocytogenes 65 infection and antigen display. *Infect Immun* 74, 1528-1536 (2006).

45. Keu KV, y col. Reporter gene imaging of targeted T cell immunotherapy in recurrent glioma. *Sci Transl Med* 9, (2017).
46. Yaghoubi SS, y col. Noninvasive detection of therapeutic cytolytic T cells with 18F-FHBG PET in a patient with glioma. *Nat Clin Pract Oncol* 6, 53-58 (2009).
- 5 47. Drent E, y col. A Rational Strategy for Reducing On-Target Off-Tumor Effects of CD38-Chimeric Antigen Receptors by Affinity Optimization. *Mol Ther*, (2017).
48. Kalergis AM, y col. Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. *Nat Immunol* 2, 229-234 (2001).
- 10 49. Valitutti S. The Serial Engagement Model 17 Years After: From TCR Triggering to Immunotherapy. *Front Immunol* 3, 272 (2012).
50. McMahan RH, McWilliams JA, Jordan KR, Dow SW, Wilson DB, Slansky JE. Relating TCR-peptide-MHC affinity to immunogenicity for the design of tumor vaccines. *The Journal of clinical investigation* 116, 2543-2551 (2006).
- 15 51. Robbins PF, y col. Single and dual amino acid substitutions in TCR CDRs can enhance antigen-specific T cell functions. *J Immunol* 180, 6116-6131 (2008).
52. Co MS, Deschamps M, Whitley RJ, Queen C. Humanized antibodies for antiviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 2869-2873 (1991).
- 15 53. Leelawattanachai J, Kwon K-W, Michael P, Ting R, Kim J-Y, Jin MM. Side-by-Side Comparison of Commonly Used Biomolecules That Differ in Size and Affinity on Tumor Uptake and Internalization. *PLoS One* 10, e0124440 (2015).
54. Jin M, y col. Directed evolution to probe protein allostery and integrin I domains of 200,000-fold higher affinity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 5758-5763 (2006).
- 20 55. Wong R, Chen X, Wang Y, Hu X, Jin MM. Visualizing and quantifying acute inflammation using ICAM-1 specific nanoparticles and MRI quantitative susceptibility mapping. *Ann Biomed Eng* 40, 1328-1338 (2012).

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de antígeno químérico (CAR) que comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: (i) un dominio I de la subunidad αL del antígeno-1 asociado a la función linfocitaria humana,
 - ii) un dominio transmembrana,
 - (iii) al menos un dominio coestimulador, y
- 5 (iv) un dominio de activación,
en donde el dominio I comprende los aminoácidos 130-310 de la ID. DE SEC. N.º: 1 con una mutación de F292A, F292S, L289G, F265S o F292G.
- 10 2. El CAR según la reivindicación 1, en donde el dominio coestimulador se selecciona del grupo que consiste en CD28, 4-1BB, ICOS-1, CD27, OX-40, GITR y DAP 10.
- 10 3. El CAR según la reivindicación 1, en donde el dominio activador es CD3 zeta.
- 10 4. Un ácido nucleico aislado que codifica el CAR de la reivindicación 1.
- 10 5. El ácido nucleico aislado según la reivindicación 4, en donde el gen para el receptor 2 de somatostatina humana (SSTR2) está unido al dominio I.
- 10 6. Células T o células citolíticas naturales modificadas para expresar el CAR de la reivindicación 1.
- 15 7. Las células CAR-T según la reivindicación 6 para usar en un método de una terapia celular adoptiva para tratar el cáncer en un sujeto que padece de cáncer, en donde las células cancerosas del sujeto sobreexpresan la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), y las células T CAR se unen a las células cancerosas para destruir las células cancerosas.
- 20 8. Las células CAR-T para usar según la reivindicación 7, en donde el cáncer es cáncer de tiroides, cáncer gástrico, cáncer pancreático o cáncer de mama.

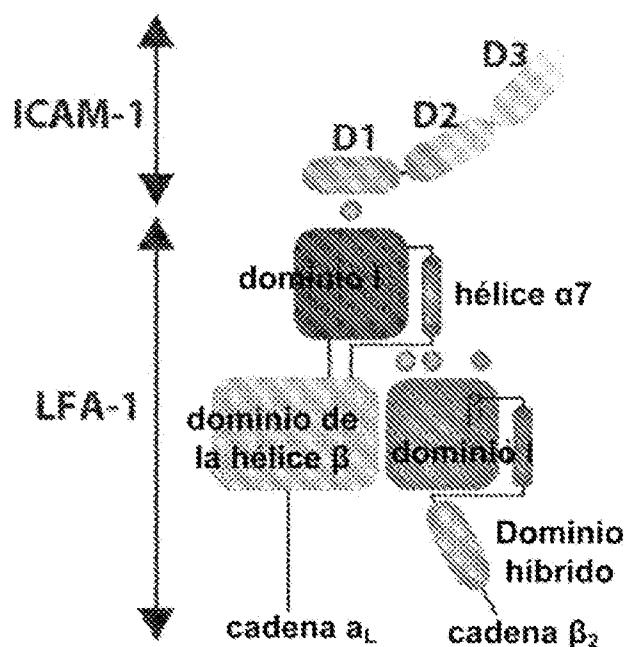


FIGURA 1A

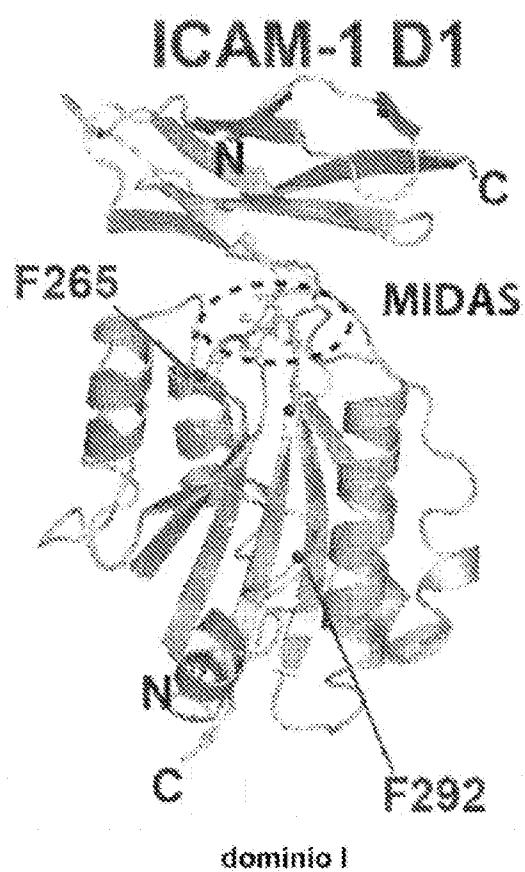


FIGURA 1B

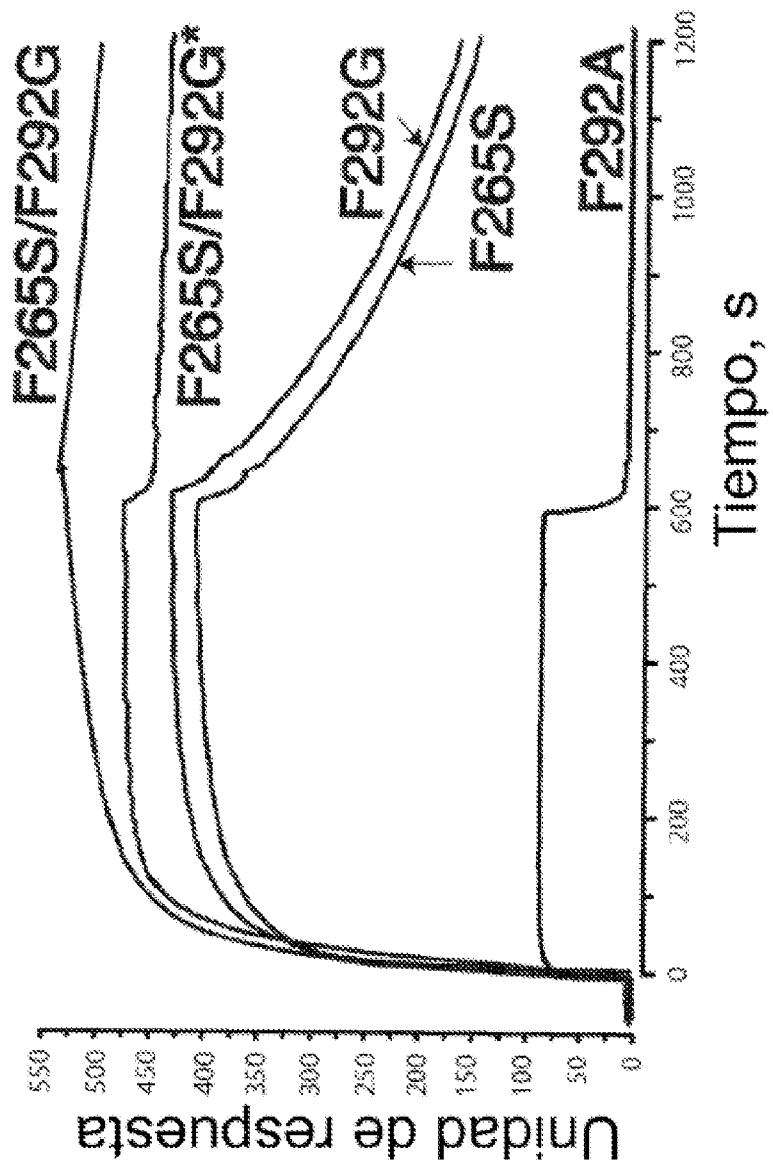


Figura 1C

ES 2 971 550 T3

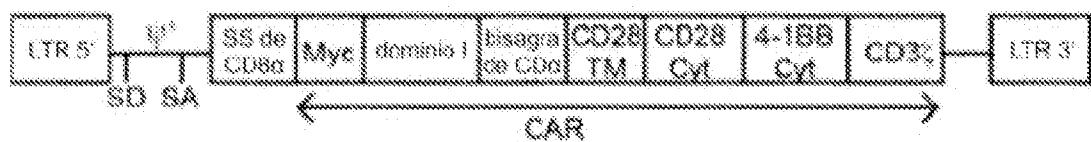


FIGURA 1D

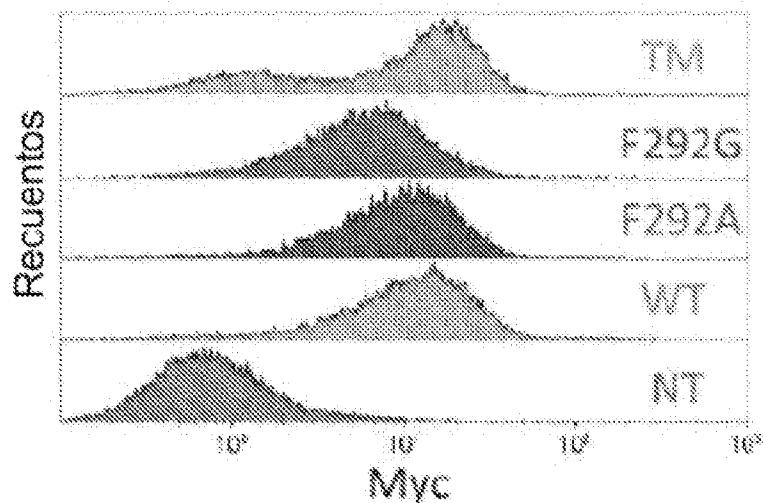


FIGURA 1E

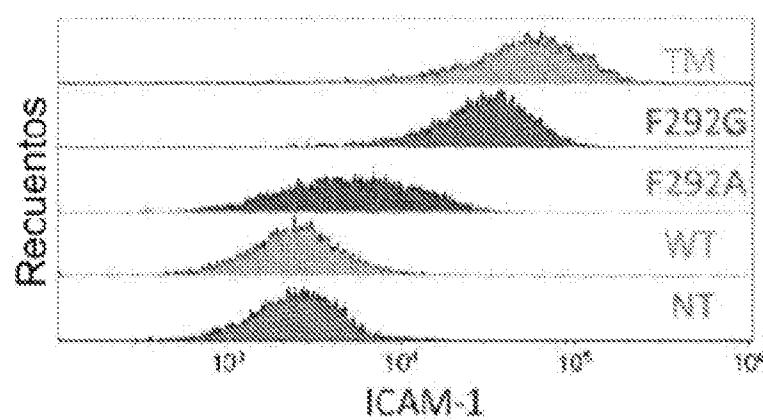


FIGURA 1F

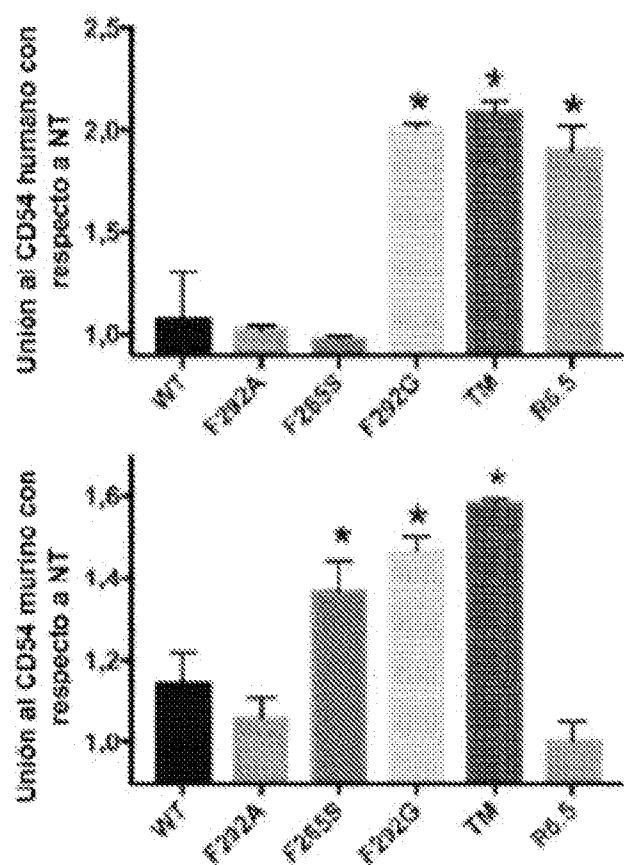


FIGURA 1G

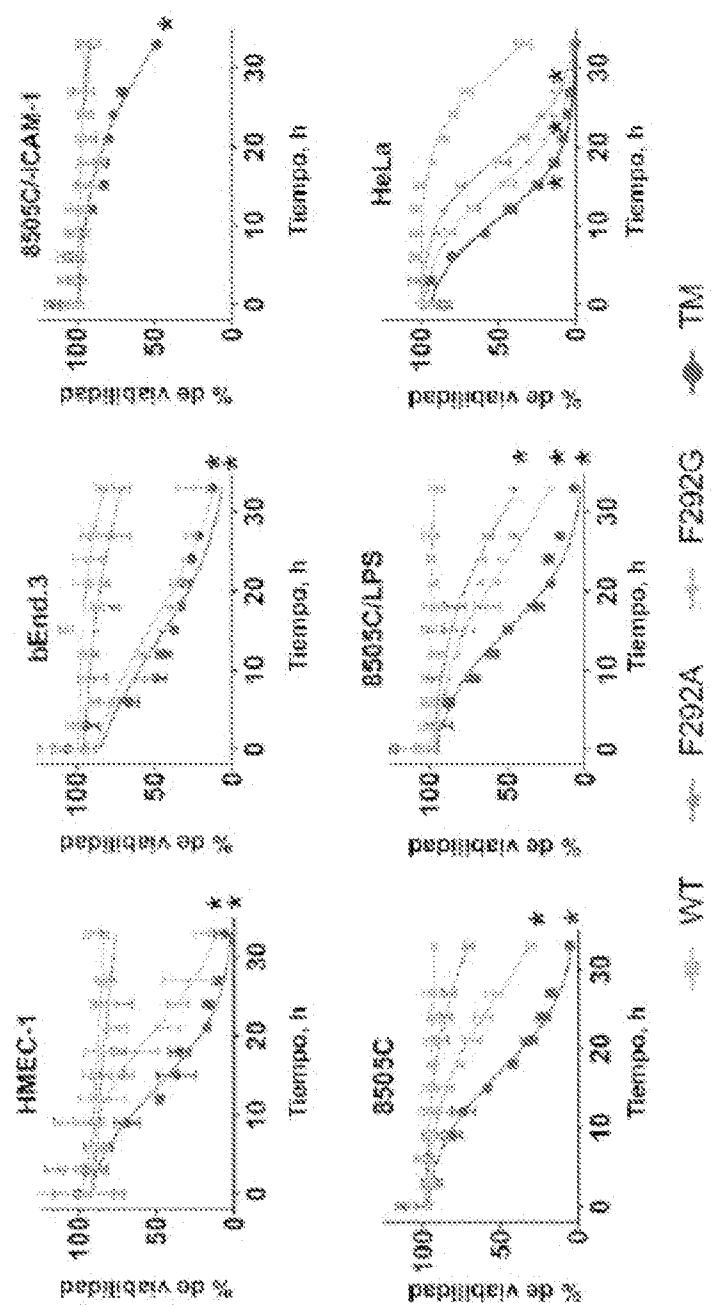


FIGURA 2A

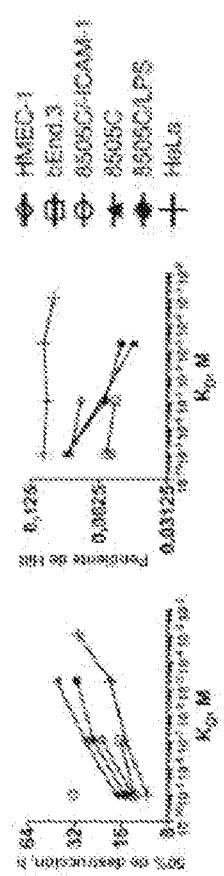


Figura 2B

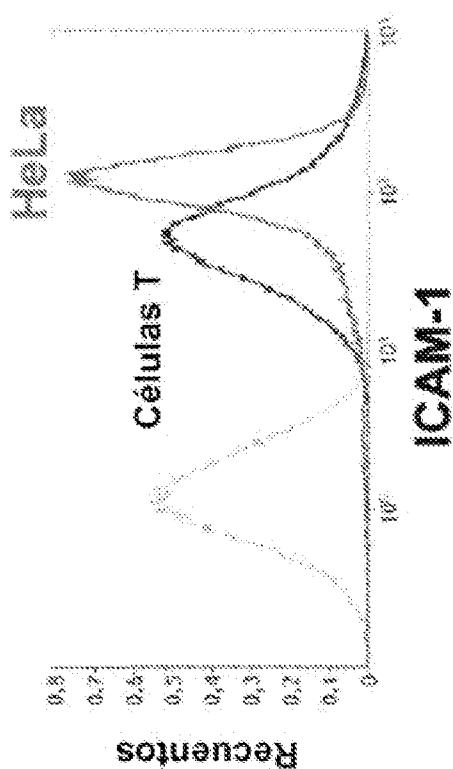


FIGURA 2C

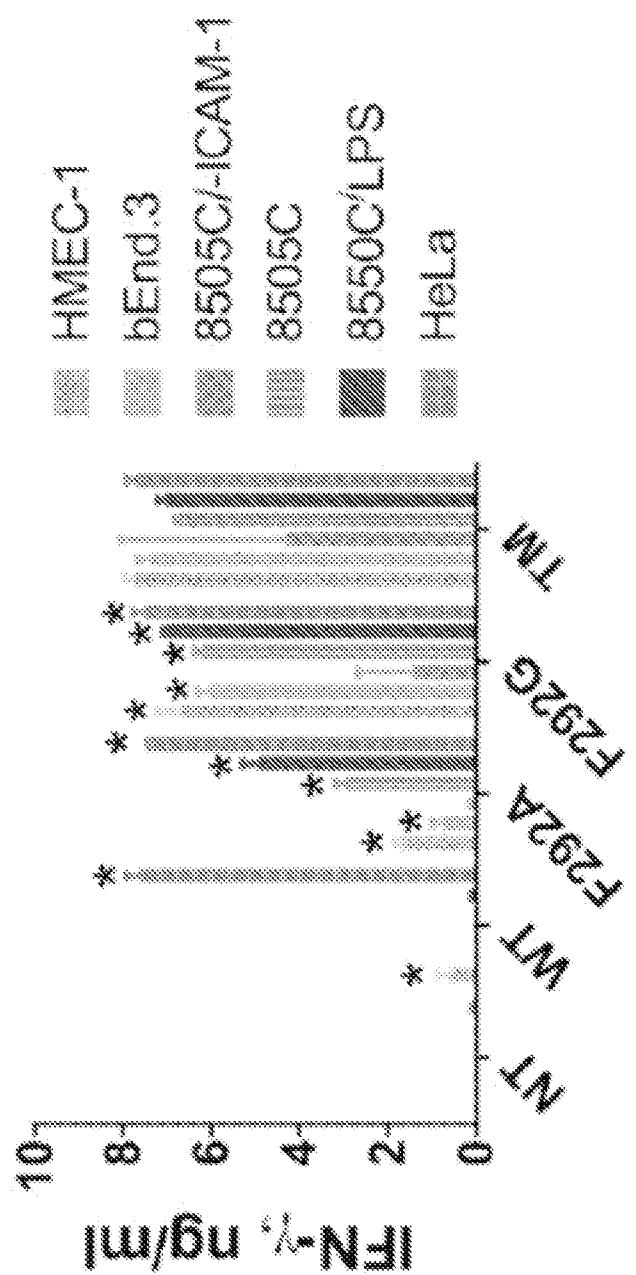


FIGURA 2D

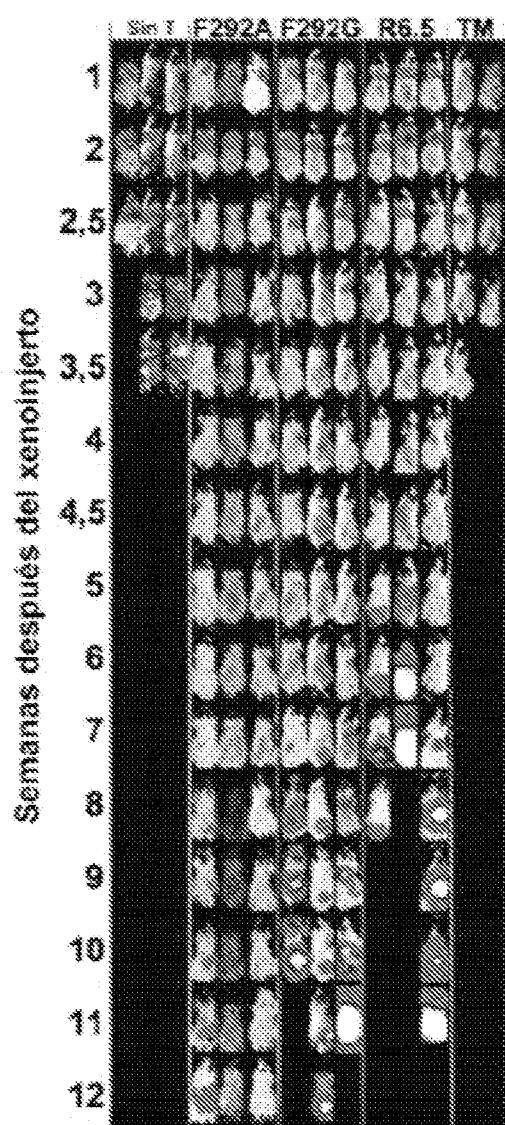


FIGURA 3A

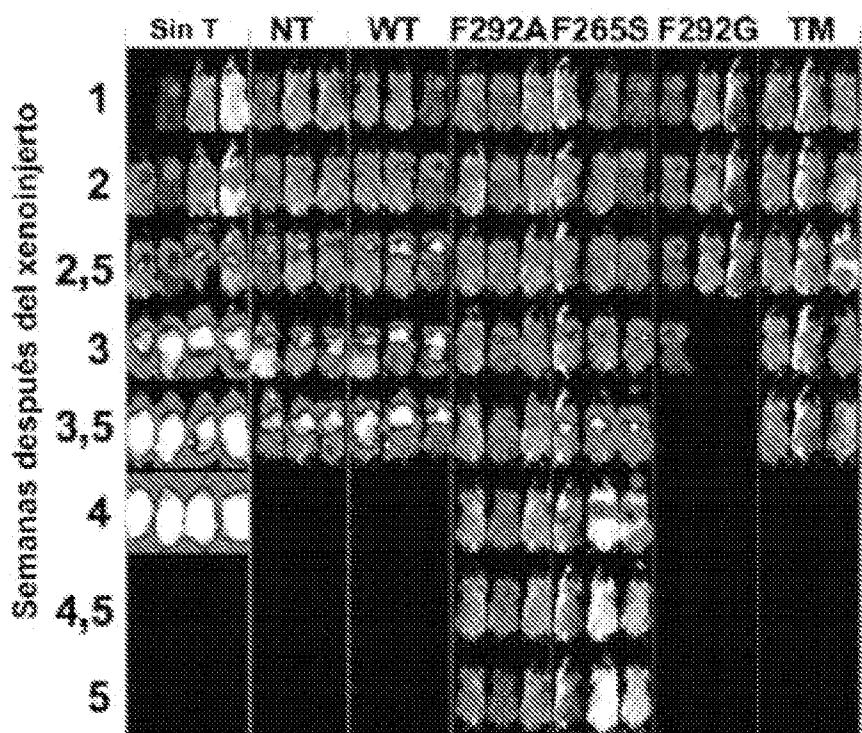
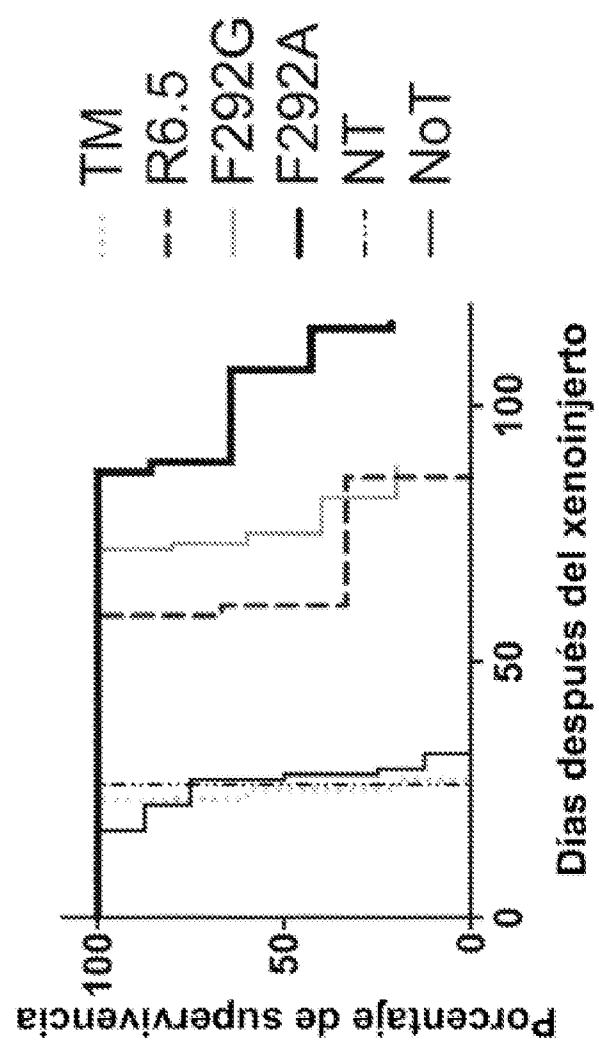


FIGURA 3B



ES 2 971 550 T3

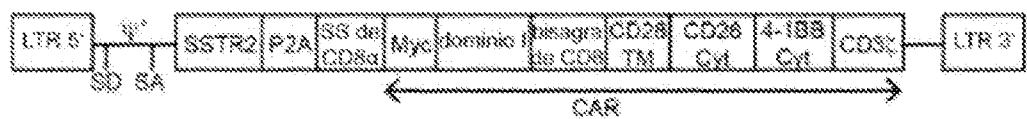


FIGURA 4A

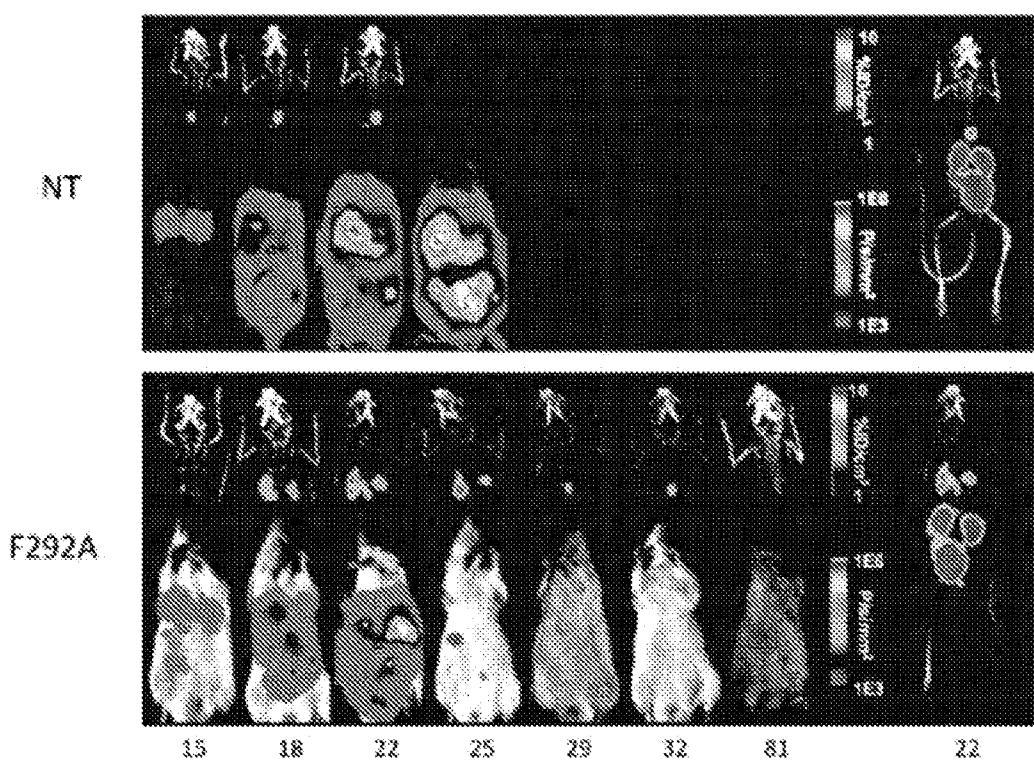


FIGURA 4B

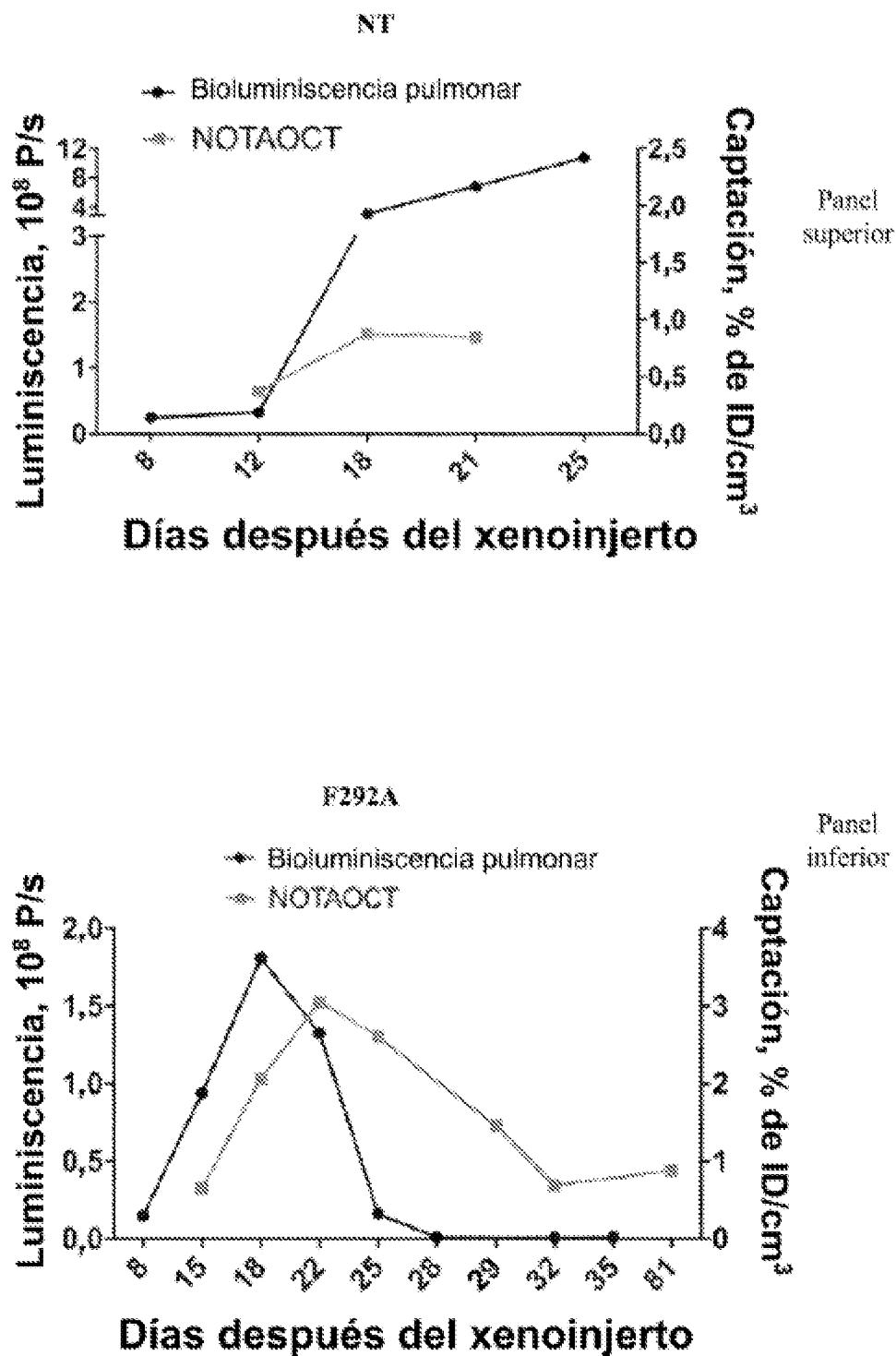


FIGURA 4C

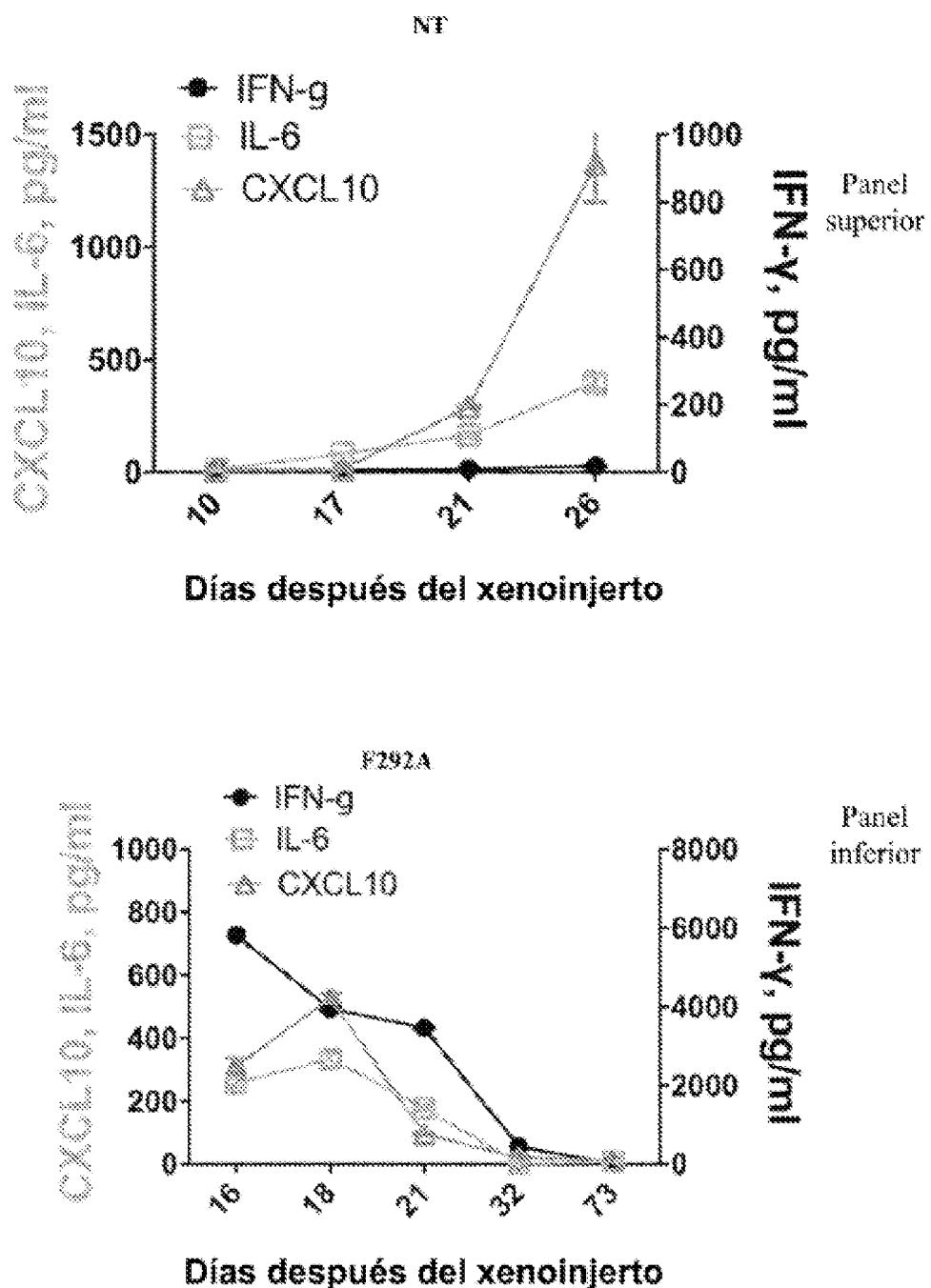


FIGURA 4D