

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 911 273**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
G01N 33/537 (2006.01)
G01N 33/542 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2019** **E 19163598 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.01.2022** **EP 3712617**

54 Título: **Método para proporcionar células personalizadas con receptores de antígeno quimérico (CAR)**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.05.2022

73 Titular/es:

MILTENYI BIOTEC B.V. & CO. KG (100.0%)
Friedrich-Ebert-Strasse 68
51429 Bergisch Gladbach, DE

72 Inventor/es:

BOSIO, ANDREAS;
HARDT, OLAF;
ECKARDT, DOMINIK y
HERBEL, CHRISTOPH

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 911 273 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

Método para proporcionar células personalizadas con receptores de antígeno quimérico (CAR)

Campo de invención

- 5 La presente invención se refiere a un método para seleccionar antígenos expuestos en células cancerosas, pero no en células sanas de un individuo para proporcionar células con receptores de antígenos quiméricos (CAR) apropiados.

Antecedentes

El cáncer es un amplio grupo de enfermedades que implican un crecimiento celular no regulado. En el cáncer, las células se dividen y crecen sin control, formando tumores malignos e invadiendo partes cercanas del cuerpo. El cáncer también puede diseminarse a partes más distantes del cuerpo a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo.

- 10 La tecnología del receptor de antígeno quimérico (CAR) puede proporcionar un enfoque prometedor para la inmunoterapia celular adoptiva para el cáncer. Comúnmente, los CAR comprenden un fragmento de cadena única variable (scFv) de un anticuerpo específico para un antígeno asociado a tumor (TAA) acoplado a través de regiones bisagra y transmembrana a dominios citoplásmicos de moléculas de señalización de células T.

- 15 Al introducir un receptor de antígeno quimérico (CAR) en las células T (en lo sucesivo, células CAR T), se generarían células T que se adaptan para reconocer las células tumorales como "células no propias" y, por lo tanto, ayudan al sistema inmunitario a erradicar las células tumorales. Por ejemplo, las células CAR T pueden ponerse en contacto con una molécula de la superficie de la célula diana que después desencadena la activación de la célula CAR T y conduce a la lisis de la célula diana.

- 20 La fabricación y el uso de células CAR T se conocen y describen, por ejemplo, en los documentos US2017107285 y EP3311832.

- 25 Las células CAR T provistas de dos receptores de antígenos se conocen a partir de CHEN CHENG ET AL, "Development of T cells carrying two complementary chimeric antigen receptors against glypican-3 and asialoglycoprotein receptor 1 for the treatment of hepatocellular carcinoma", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN/HEIDELBERG, vol. 66, no. 4, doi:10.1007/S00262-016-1949-8, ISSN 0340-7004, (20161229), páginas 475 - 489

Además, XIAOLU HAN ET AL, describen en "Masked Chimeric Antigen Receptor for Tumor-Specific Activation", MOLECULAR THERAPY, (20170101), vol. 25, no. 1, ISSN 1525-0016, páginas 274 - 284 el uso de células CAR que se bloquean a demanda para evitar que la célula CAR se una a células no tumorales.

Sin embargo, el desarrollo de células CAR T efectivas enfrenta, entre otros, los siguientes problemas:

- 30 i) Una (1) molécula de superficie a veces no es lo suficientemente específica, también puede expresarse en células no tumorales (problema de seguridad)
- ii) una molécula de superficie no se expresa en todas las células tumorales, las células tumorales que sobreviven (escapan) conducen a una recaída
- iii) las células tumorales cierran la expresión de la molécula de superficie y escapan a la terapia
- 35 iv) el nivel de expresión del antígeno o la afinidad del aglutinante único podría ser demasiado bajo para permitir una activación eficiente de las células T
- iv) la fuerte heterogeneidad de la expresión del antígeno dentro de las muestras tumorales, así como entre las muestras tumorales, requiere un perfil personalizado de la expresión del marcador tumoral (cinética), algunos marcadores incluso aparecen en todas o en ninguna de las células tumorales del mismo tipo.

- 40 Una forma potencial de abordar los problemas mencionados anteriormente es utilizar más de una molécula de superficie como diana, es decir, las denominadas "células CAR T DUAL" que detectan más de una diana en una célula determinada.

- 45 El enfoque de "Células CAR T DUAL" no se ha establecido correctamente hasta el momento, especialmente dado que cuanto más compleja debe ser una combinación de dianas múltiples para atacar adecuadamente a un tumor, es menos probable que está determinada combinación se adapte a más de uno o pocos pacientes (necesidad de personalización de la terapia). Además, si el tumor sigue creciendo después de una primera terapia, es muy probable que se deba encontrar una nueva combinación de CAR para erradicar aún más el tumor.

- 50 Además, para realizar un fenotipado personalizado de la expresión del marcador tumoral para un paciente individual, es necesario desarrollar combinaciones de CAR y células CAR T en un marco de tiempo aceptable que dicta el paciente y la indicación. En la práctica clínica, un marco de tiempo óptimo sería un par de semanas.

En consecuencia, el éxito de cualquier inmunoterapia para el cáncer basada en células CAR dependerá de una selección rápida y fiable de antígenos específicos para las respectivas células tumorales.

Se ha encontrado que un grupo distinto de antígenos de superficie celular se expresa en células cancerosas humanas, pero no o en un nivel más bajo en células no malignas. Estos antígenos (también denominados "marcadores") se pueden usar para identificar y/o marcar y/o destruir y/o desactivar los mecanismos de escape de tales células cancerosas a través de ligandos que se unen específicamente a los marcadores.

Por lo tanto, el objeto de la invención era proporcionar un método para seleccionar antígenos específicos para células cancerosas, que no se expresan en tejido sano, para diseñar células que luego matan/lisan células cancerosas sin atacar células no tumorales.

10 Sumario de la invención

Un primer objeto de la invención es un procedimiento para proporcionar una célula que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico para uno o más antígenos diana expuestos en células tumorales caracterizado por proporcionar una muestra celular que comprende células tumorales y no tumorales y repetir las etapas

- poner en contacto el tejido celular con un conjugado que comprende un resto fluorescente y un resto que reconoce el antígeno (en lo sucesivo denominado "conjugado")
- eliminar el conjugado no unido del tejido celular y detectar las células unidas al conjugado mediante la radiación de fluorescencia emitida por los restos fluorescentes de los primeros conjugados
- eliminar la radiación de fluorescencia emitida por los restos fluorescentes de los conjugados

con conjugados que comprenden un resto fluorescente y restos que reconocen antígenos que reconocen diferentes antígenos

hasta identificar al menos dos conjugados provistos de restos que reconocen antígenos que reconocen diferentes antígenos, que se unen a células tumorales, pero esencialmente no a células no tumorales y

proporcionar células o una muestra de células o una población de células con al menos dos restos de reconocimiento de antígeno identificados, preferiblemente 2, 3, 4 o 5, como receptor de antígeno quimérico (CAR).

La célula que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) puede seleccionarse del grupo que consiste en células T, células NK o células diseñadas para destruir (lisan) otras células cuando se activan al unirse a la otra célula.

Dado que un tumor puede destruirse incluso si solo se identifica o ataca una parte de las células tumorales, no es necesario que los conjugados identificados se unan a todas las células tumorales. Preferiblemente, el procedimiento de la invención se realiza hasta identificar al menos dos conjugados provistos de restos que reconocen antígenos que reconocen diferentes antígenos, que se unen a al menos el 1%, más preferiblemente al menos al 10% y más preferiblemente al menos al 30% de las células tumorales.

Si bien se desea que los conjugados se unan al 0% de las células no tumorales, es aceptable para la terapia que se dirijan una cierta cantidad de células no tumorales. Preferiblemente, el procedimiento de la invención se realiza hasta identificar al menos dos conjugados, al menos provistos de restos que reconocen antígenos que reconocen diferentes antígenos, que se unen a células tumorales y hasta un 10% como máximo, más preferiblemente hasta un 5% como máximo y lo más preferiblemente hasta un 1% como máximo de las células no tumorales del mismo tipo de tejido u órgano. El término "mismo tipo de tejido u órgano" se refiere, por ejemplo, al páncreas o al hígado.

El procedimiento de la invención permite la identificación rápida de uno o más conjuntos de dos conjugados provistos de restos de reconocimiento de antígenos que reconocen diferentes antígenos y una o más células diferentes subsiguientes con al menos dos restos de reconocimiento de antígenos identificadas como receptor de antígeno quimérico (CAR). Proporcionar más de un conjunto de conjugados y más de una célula CAR aumenta las posibilidades de destruir las células tumorales y/o atacar las células tumorales que regulan a la baja los antígenos para escapar de ser diana.

45 Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 muestra los dominios generales de un receptor de antígeno quimérico (CAR)

Fig. 2 muestra conceptos generales de construcción de receptores de antígenos quiméricos

Fig. 3 muestra esquemáticamente la función de una celda CAR-T provista de una lógica AND

Fig. 4 muestra esquemáticamente la función de una celda CAR-T provista de una lógica NOT

- Fig. 5 muestra la tinción de una y la misma muestra de cáncer de páncreas con una pluralidad de conjugados que comprenden un resto fluorescente y un resto que reconoce antígenos para detectar marcadores que se expresan en células de cáncer de páncreas.
- Fig. 6 muestra un marcaje comparativo de marcadores seleccionados en células de cáncer de páncreas y tejido sano para detectar combinaciones de marcadores que marcan específicamente células de cáncer de páncreas, pero no tejido sano.
- Fig. 7 muestra un etiquetado del carcinoma de ovario seroso de alto grado para identificar posibles candidatos diana.
- Fig. 8 muestra un análisis de expresión comparativo de marcadores seleccionados en carcinoma de ovario seroso de alto grado y tejidos sanos para detectar combinaciones de marcadores que marcan específicamente células de carcinoma de ovario, pero no tejido sano.

Definiciones

El término "receptor de antígeno quimérico" o "CAR" se refiere a células modificadas genéticamente que cuentan con una nueva especificidad procedente de diferentes fuentes.

- El término "tumor" se conoce en medicina como "neoplasia". No todos los tumores son cancerosos; los tumores benignos no invaden los tejidos vecinos y no se diseminan por todo el cuerpo. El procedimiento de la invención se puede aplicar tanto en neoplasmas como en tumores benignos.

El término "cáncer" se refiere a un amplio grupo de enfermedades que implican un crecimiento celular no regulado. En el cáncer, las células (células cancerosas) se dividen y crecen sin control, formando tumores malignos e invadiendo partes cercanas del cuerpo. El cáncer también puede diseminarse a partes más distantes del cuerpo a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo.

Los términos "aglutinante" o "se une específicamente" o "específico para" con respecto a un dominio de unión a antígeno de un ligando como un anticuerpo, de un fragmento del mismo o de un CAR se refieren a un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a un antígeno específico, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra. Un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de una especie también puede unirse a ese antígeno de otra especie. Esta reactividad entre especies no es contraria a la definición de ese dominio de unión a antígeno como específico. Un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno también puede unirse a diferentes formas alélicas del antígeno (variantes alélicas, variantes de corte y empalme, isoformas, etc.). Esta reactividad cruzada no es contraria a la definición de ese dominio de unión a antígeno como específico.

Los términos "célula modificada por ingeniería" y "célula modificada genéticamente" como se usan en el presente documento pueden usarse indistintamente. Los términos significan contener y/o expresar un gen extraño o una secuencia de ácido nucleico que a su vez modifica el genotipo o fenotipo de la célula o su progenie. Especialmente, los términos se refieren a células, preferentemente células T que se manipulan mediante métodos recombinantes bien conocidos en la técnica para expresar de forma estable o transitoria péptidos o proteínas que no se expresan en estas células en el estado natural. Por ejemplo, las células T se modifican para expresar una construcción artificial como un receptor de antígeno quimérico en su superficie celular. Por ejemplo, las secuencias que codifican CAR pueden administrarse en células utilizando un vector retroviral o lentiviral.

El término "diana", como se usa en el presente documento, se refiere a un antígeno o epítipo asociado con una célula que debe reconocerse específicamente por un dominio de unión a antígeno, p. ej., un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo o de un CAR. El antígeno o epítipo para el reconocimiento de anticuerpos puede unirse a la superficie celular pero también puede secretarse, formar parte de la membrana extracelular o desprenderse de la célula.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos policlonales o monoclonales y fragmentos de los mismos, que pueden generarse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. El anticuerpo puede ser de cualquier especie, p. ej., ratones, ratas, ovejas, humanos. Para fines terapéuticos, si se van a utilizar fragmentos de unión a antígenos no humanos, estos pueden humanizarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos modificados (p. ej., oligómeros, anticuerpos reducidos, oxidados y marcados).

El término "célula asesina", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que puede matar/destruir/lisar otra célula, p. ej., una célula cancerosa. Con mayor frecuencia, las células T, las células NK, las células dendríticas y los macrófagos pueden usarse como células asesinas.

El término "célula asesina modificada por ingeniería", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula asesina que se modifica genéticamente para permitir la destrucción específica de una célula diana, p. ej., una célula modificada con un CAR contra un objetivo para destruir la célula tumoral que expresa el objetivo respectivo.

Descripción detallada de la invención

El procedimiento de la invención permite la identificación rápida de conjuntos adecuados de conjugados y la subsiguiente ingeniería rápida de células CAR apropiadas para destruir las células tumorales de una muestra de células. La muestra de células que comprende células tumorales y no tumorales procede preferiblemente del mismo tejido u órgano del mismo paciente.

Para distinguir células tumorales y no tumorales en una muestra de células, un experto en la materia, como un patólogo, puede decidir según criterios conocidos o *lege artis* en oncología si la muestra de células contiene un tumor y, en caso afirmativo, qué partes de la muestra de células. Estos criterios son, por ejemplo, las directrices publicadas por Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) y pueden implicar, p. ej., la morfología de las células, la estructura del tejido, la ploididad, la expresión de biomarcadores (tales como Her2, p53, BRAC1, APC, EGFR, etc.).

A continuación, la muestra de células se pone en contacto con una pluralidad de aglutinantes para caracterizar el patrón de reconocimiento y seleccionar aglutinantes específicos para las células tumorales y aglutinantes específicos para las células no tumorales. Los aglutinantes así identificados se pueden usar para la terapia posterior como se especifica más adelante.

En una variante del procedimiento, al menos dos conjugados provistos de restos que reconocen antígenos que reconocen diferentes antígenos se unen a al menos el 20% de las células tumorales y menos del 5% de las células no tumorales de la muestra de células. Preferiblemente, al menos dos conjugados provistos de restos que reconocen antígenos que reconocen diferentes antígenos se unen a al menos el 50% de las células tumorales y menos del 5% de las células no tumorales de la muestra de células. Más preferiblemente, al menos dos conjugados provistos de restos que reconocen antígenos que reconocen diferentes antígenos se unen a al menos el 70% de las células tumorales y menos del 5% de las células no tumorales de la muestra de células.

En otra variante, caracterizada porque los al menos dos conjugados provistos de restos de reconocimiento de antígenos destruyen al menos 10 veces, preferiblemente al menos 50 veces, más preferiblemente al menos 100 veces más células tumorales que células no tumorales de la muestra celular.

El procedimiento de la invención implicó identificar al menos dos conjugados provistos de restos que reconocen antígenos que reconocen diferentes antígenos, que se unen a células tumorales, pero esencialmente no a células no tumorales.

Si el CAR está provisto de al menos dos restos de reconocimiento de antígenos, el CAR puede activarse para actuar en diferentes puertas lógicas. Las puertas lógicas han sido descritas en la literatura como celdas CAR tipo "AND", "NOT", "OR". Como se describe con más detalle más adelante, en el procedimiento de la invención, los al menos dos restos que reconocen antígenos se proporcionan como tipo AND, OR o NOT y/o los al menos dos con restos que reconocen antígeno se proporcionan como tipo ADAPTER. Los al menos dos restos que reconocen antígenos en todas estas variantes se proporcionan como receptores de antígenos quiméricos (CAR).

Receptor de antígeno quimérico (CAR)

Como se muestra en general en las figuras 1 y 2, un receptor de antígeno quimérico (CAR) puede comprender un dominio extracelular que comprende el dominio de unión al antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. El dominio extracelular puede unirse al dominio transmembrana mediante un enlazador. El dominio extracelular también puede estar unido a un péptido señal.

El término "péptido señal" se refiere a una secuencia peptídica que dirige el transporte y la localización de la proteína dentro de una célula, p. ej., a un determinado orgánulo celular (tal como el retículo endoplásmico) y/o la superficie celular.

El término "dominio de unión a antígeno" se refiere a la región de CAR que se une específicamente a un antígeno (y por lo tanto es capaz de dirigirse a una célula que contiene un antígeno). Los CAR obtenidos por la invención pueden comprender uno o más dominios de unión a antígeno. Generalmente, el dominio de unión al antígeno en el CAR es extracelular. El dominio de unión a antígeno puede comprender un anticuerpo o un fragmento del mismo. El dominio de unión a antígeno puede comprender, por ejemplo, cadena pesada de longitud completa, fragmentos Fab, fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos divalentes de cadena sencilla o diacuerpos. Cualquier molécula que se una específicamente a un antígeno dado, como anticuerpos o dominios de unión a ligandos de receptores naturales, puede usarse como un dominio de unión a antígeno. A menudo, el dominio de unión al antígeno es un scFv. Normalmente, en un scFv, las porciones variables de una cadena pesada y una cadena ligera de inmunoglobulina se fusionan mediante un conector flexible para formar un scFv. Tal enlazador puede ser, por ejemplo, el "(G4/S1)₃-enlazador".

El dominio transmembrana del CAR puede comprender, por ejemplo, una secuencia de los dominios transmembrana de 4-1BB, CD8 y/o CD28. Además, puede estar presente un dominio de señalización intracelular activador que comprenda una secuencia de los dominios de señalización intracelular de CD28, CD137 o CD3zeta.

Como alternativa a un dominio de señalización intracelular activador, el CAR puede comprender un dominio de señalización intracelular inhibidor que tiene una secuencia de los dominios de señalización intracelular tales como PD1 o CTLA4.

5 En una variante preferida de esta realización, el receptor de antígeno quimérico (CAR) comprende un dominio de unión a antígeno específico para CD20 sin un dominio de unión a antígeno adicional o CAR adicional, en donde el dominio de unión a antígeno está conjugado con un dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización. Esta variante se muestra a modo de ejemplo en la Fig. 2A.

10 En algunos casos, es beneficioso que el dominio de unión al antígeno se derive de la misma especie en la que se usará el CAR. Por ejemplo, si el CAR está destinado a usarse terapéuticamente en humanos, puede ser beneficioso para el dominio de unión a antígeno del CAR para comprender un anticuerpo humano o humanizado o un fragmento del mismo. Los anticuerpos humanos o humanizados o fragmentos de los mismos pueden prepararse mediante una variedad de métodos bien conocidos en la técnica.

15 Los términos "espaciador" o "bisagra", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a la región hidrófila que se encuentra entre el dominio de unión al antígeno y el dominio transmembrana. Los CAR identificados por la invención pueden comprender un dominio espaciador extracelular pero también es posible omitir dicho espaciador. El espaciador puede incluir fragmentos Fc de anticuerpos o fragmentos de los mismos, regiones bisagra de anticuerpos o fragmentos de los mismos, regiones CH2 o CH3 de anticuerpos, proteínas accesorias, secuencias espaciadoras artificiales o combinaciones de las mismas. Un ejemplo destacado de un espaciador es la bisagra CD8alpha.

20 El dominio transmembrana del CAR se puede derivar de cualquier fuente natural o sintética deseada para dicho dominio. Si la fuente es natural, el dominio puede derivar de cualquier proteína transmembrana o unida a la membrana.

25 El dominio citoplasmático o el dominio de señalización intracelular del CAR de la invención es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se expresa el CAR. "Función efectora" significa una función especializada de una célula, p. ej., en una célula T, una función efectora puede ser actividad citolítica o actividad auxiliar, incluyendo la secreción de citoquinas. El dominio de señalización intracelular se refiere a la parte de una proteína que transduce la señal de función efectora y dirige la célula que expresa el CAR de la invención para realizar una función especializada. El dominio de señalización intracelular puede incluir cualquier parte completa o truncada del dominio de señalización intracelular de una proteína dada suficiente para transducir la señal de función efectora.

30 Los ejemplos destacados de dominios de señalización intracelular para uso en los CAR incluyen las secuencias citoplásmicas del receptor de células T (TCR) y los correceptores que actúan en concierto para iniciar la transducción de señales después de la participación del receptor del antígeno.

35 En cuanto a las CAR con al menos dos dominios de unión a antígeno, los dominios de unión a antígeno pueden tener funciones diferentes. El procedimiento de la invención reduce el tiempo de desarrollo de nuevas células CAR adecuadas para el tratamiento de tumores que se pueden proporcionar como células CAR de tipo "AND", "NOT", "OR".

40 En una realización de la invención, la célula CAR solo se activará, es decir, la señal del dominio de señal solo se activará cuando ambos dominios de unión a antígeno se unan a sus respectivos antígenos. Tales células CAR se denominan en lo sucesivo "AND-CAR". Los dominios de unión a antígeno de las células "AND-CAR" pueden identificarse mediante el método de la presente invención mediante la identificación, por ejemplo, de dos antígenos ubicados en células tumorales de los cuales ninguno o como máximo uno se expresa en células sanas. La Fig. 3 (publicado en Transl Cancer Res 2016;5(S 1):S61-S65) muestra cómo los AND-CAR son desactivados por células sanas (i) y (ii) pero activados por células tumorales (iii).

45 En otra realización de la invención, la célula CAR solo se activará, es decir, la señal del dominio de señal solo se activará cuando un dominio de unión a antígeno se una a sus respectivos antígenos y el otro no. Tales células CAR se denominan en lo sucesivo "NOT-CAR". Los dominios de unión a antígeno de las células "NOT-CAR" pueden identificarse mediante el método de la presente invención mediante la identificación, por ejemplo, dos antígenos ubicados en células sanas, de los cuales solo uno se expresa en células tumorales. La Fig. 4 (publicado en Transl Cancer Res 2016;5(S1):S61-S65) muestra cómo los NOT-CAR son desactivados por células sanas (i) pero activados por células tumorales (ii).

50 En otra realización más de la invención, la célula CAR ya estará activada, es decir, la señal del dominio de señal se activará cuando solo uno de los dos dominios de unión a antígeno se una a sus respectivos antígenos. Tales células CAR se denominan en lo sucesivo "OR-CAR". Los dominios de unión a antígeno de las células "OR-CAR" pueden identificarse mediante el método de la presente invención mediante la identificación, por ejemplo, dos antígenos ubicados en células tumorales, pero no en células sanas.

55 Se puede lograr una mayor reducción en el tiempo de procesamiento mediante el uso de la tecnología denominada "ADAPTER CAR". Una célula "ADAPTER CAR" comprende un dominio de señalización, un dominio transmembrana y un dominio enlazador que no tiene propiedades de reconocimiento de antígenos. A este dominio enlazador, se

conjugan entonces uno o más restos que reconocen antígenos (enlazador más molécula = adaptador). En consecuencia, en el procedimiento según la invención, los al menos dos con restos de reconocimiento de antígeno como receptor de antígeno quimérico (CAR) pueden proporcionarse como ADAPTER-typ.

5 En una variante de la invención, las células reciben al menos dos restos de reconocimiento de antígeno identificadas como receptor de antígeno quimérico (CAR) proporcionando una célula que comprende biotina como resto de reconocimiento de antígeno de un receptor de antígeno quimérico (CAR) y proporcionando conjugados de los identificó al menos dos restos de reconocimiento de antígenos con un resto anti-biotina y conjugando dichos conjugados con dichas células.

10 En otra variante de la invención, a la célula se le proporcionan al menos dos restos de reconocimiento de antígeno identificadas como receptor de antígeno quimérico (CAR) proporcionando una célula que comprende biotina como resto de reconocimiento de antígeno de un primer receptor de antígeno quimérico (CAR) y un segundo epítipo. como resto de reconocimiento de antígeno de un segundo receptor de antígeno quimérico (CAR) y proporcionando conjugados de al menos dos restos de reconocimiento de antígeno identificados con un resto anti-biotina y un segundo resto que conjuga dichos conjugados con dichas células.

15 Los enlazadores adecuados son moléculas que no están presentes en el cuerpo de un mamífero (humano) o que tienen una baja afinidad por los anticuerpos naturales en el cuerpo de un mamífero (humano). Son adecuadas, por ejemplo, unidades de biotina o biotina modificada que se identifican mediante un adaptador apropiado como un anticuerpo anti-biotina que se conjuga con el conjugado deseado con el resto que reconoce el antígeno.

20 La tecnología "ADAPTER CAR" se describe en el documento PCT/EP2017/077545 y utiliza los términos " epítipo enlazador/ marcador" (LLE) para el enlazador unido a la célula CAR.

Preferiblemente, el LLE no provoca una reacción inmunitaria en un sujeto destinado a ser tratado con células que expresan CAR. Esto se puede lograr mediante el uso de un dominio de unión a LLE extracelular de un CAR que se deriva de una molécula que reconoce un epítipo natural, tal que el LLE se une con una preferencia mayor que al resto de marcador endógeno sin resto enlazador, es decir, la molécula de origen natural en el sujeto (el autoantígeno).

25 Por ejemplo, un dominio de unión a LLE extracelular de un CAR se une con una afinidad al menos dos veces, preferiblemente al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 10 veces mayor a dicha LLE que a dicha molécula de origen natural.

30 En el caso de las células CAR "ADAPTOR", la célula CAR provista de la unidad de enlace y el adaptador se aplican en paralelo al paciente. La ventaja de esta realización es que la célula CAR con un enlazador puede prepararse independientemente de los restos de reconocimiento de antígeno identificados y no tiene que desarrollarse desde cero. Solo se debe generar y probar el adaptador. Este enfoque también permite controlar la fuerza y la cinética de la terapia, de forma similar a una quimioterapia convencional.

Procedimiento de detección

35 Para investigar una pluralidad de aglutinantes o conjugados potenciales, se prefiere extinguir la radiación de fluorescencia emitida por los restos fluorescentes mediante la degradación enzimática de los conjugados. Tales conjugados se describen, por ejemplo, en los documentos EP3037821A1, EP16203689.1 o EP 16203607.3.

Como alternativa, la radiación de fluorescencia emitida por los restos fluorescentes se extingue mediante radiación.

Uso para el tratamiento del cáncer

40 El cáncer a tratar puede incluir cáncer hematopoyético, síndrome mielodisplásico, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, tumores cutáneos, enfermedad residual mínima (MRD) en leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de colon, melanoma u otro cáncer hematológico y tumores sólidos, o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el cáncer incluye un cáncer hematológico tal como leucemia (p. ej., leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML) o leucemia mielógena crónica (CML), linfoma (p. ej., leucemia del manto linfoma de células no Hodgkin, linfoma no Hodgkin o linfoma de Hodgkin) o mieloma múltiple, o cualquier combinación de los mismos. Además, el cáncer puede incluir un carcinoma adulto que comprende cáncer de coral y faringe (lengua, boca, faringe, cabeza y cuello), cánceres del sistema digestivo (esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto, ano, hígado, conducto biliar intrahepático, vesícula biliar, páncreas), cánceres del sistema respiratorio (laringe, pulmón y bronquios), cánceres de huesos y articulaciones, cánceres de tejidos blandos, cánceres de piel (melanoma, y carcinoma de células escamosas), tumores pediátricos (neuroblastoma, rabdomiosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing), tumores del sistema nervioso central (cerebro, astrocitoma, glioblastoma, glioma) y cánceres de mama, sistema genital tallo (cuello uterino, cuerpo uterino, ovario, vulva, vagina, próstata, testículos, pene, endometrio), sistema urinario (vejiga urinaria, riñón y pelvis renal, uréter), ojo y órbita, sistema endocrino (tiroides), y el cerebro y otro sistema nervioso, o cualquier combinación de los mismos.

El tratamiento del cáncer puede abarcar cualquier método que implique al menos un antígeno como se describe o cualquier combinación de antígenos como se describe como molécula diana. Tales métodos pueden ser, p. ej., el tratamiento con agentes que se unen al antígeno y afectan la viabilidad de la célula cancerosa que expresa este antígeno, matan preferentemente a la célula cancerosa. Algunos ejemplos son los virus oncolíticos, los BiTE[®], ADCC e inmunotoxinas como ya se ha descrito.

Para el tratamiento, las células inmunitarias, p. ej., las células T de un sujeto pueden aislarse. El sujeto puede padecer dicho cáncer o puede ser un sujeto sano. Estas células se modifican genéticamente in vitro o in vivo para expresar uno o más CAR de la invención. Estas células modificadas por ingeniería pueden activarse y expandirse in vitro o in vivo. En una terapia celular, estas células modificadas por ingeniería pueden infundirse a un receptor que las necesite. Las células infundidas pueden matar (o al menos detener el crecimiento de) células cancerosas que expresan uno o más de los antígenos descritos en el receptor. El receptor puede ser el mismo sujeto del que se obtuvieron las células (terapia celular autóloga) o puede ser de otro sujeto de la misma especie (terapia celular alogénica).

Por ejemplo, las células con los siguientes restos de reconocimiento de antígenos como receptores de antígenos quiméricos (CAR) se pueden usar para tratar ciertos tipos de cáncer:

- a) CLA, TSPAN8 como marcador positivo que son exclusivos para tumor, p. ej., tumor pancreático
- b) CLA como marcador positivo y CD45 como marcador NOT para discriminar el tumor de las células sanas, p. ej., tumor pancreático
- c) Epcam y CD90 como marcador positivo que son exclusivos para tumor, p. ej., cáncer de ovarios
- d) SSEA4 como marcador positivo y CD34 y CD133 como marcador negativo para discriminar el tumor de las células sanas, p. ej., cáncer de mama

Ejemplos

Los siguientes ejemplos pretenden una explicación más detallada de la invención, pero sin limitar la invención a estos ejemplos.

Ejemplo 1: Identificación de combinaciones de conjugados que comprenden un resto fluorescente y un resto que reconoce antígenos que en combinación permiten discriminar entre células de carcinoma de páncreas (PaCa) y células que no son PaCa.

Se analizó un carcinoma de páncreas (PaCa) de un paciente mediante tinción posterior con diferentes conjugados de fluorocromos de anticuerpos, imágenes y decoloración.

Se fijaron criosecciones de la muestra de PaCa y cada espécimen se tiñó con 101 anticuerpos marcados con fluorescencia y el colorante de marcado nuclear DAPI (Fig. 5). Las imágenes así obtenidas se analizaron para la cuantificación de antígenos y el reconocimiento de patrones a nivel de píxeles individuales y células segmentadas.

Para reducir la selección de objetivos potenciales, se seleccionaron conjugados de anticuerpos que mostraban un patrón de tinción similar al observado al teñir la misma muestra con un conjugado de fluorocromo de anticuerpo anti-EpCAM+ (CD326). EpCAM es bien conocido en el campo por su expresión en una variedad de carcinomas y tejidos epiteliales humanos. Esto se aplica, por ejemplo, a CLA, CD66c, CD318 y TSPAN8 como se muestra en la Fig. 5.

Posteriormente, se evaluó el patrón de tinción de 20 anticuerpos conjugados con fluorocromo de objetivos potenciales como CLA, CD66c, CD318 y TSPAN8 en 16 tejidos adyacentes sanos o normales (NAT) en el mismo procedimiento de tinción/imagen/destinción con los resultados que se muestran en la Fig. 6. Esto se llevó a cabo para evaluar la expresión fuera del tumor de los antígenos de interés, permitiendo así la predicción de la toxicidad potencial fuera del tumor en el objetivo de los candidatos objetivo. En la Fig. 6 a-c se muestran ejemplos de este análisis para los marcadores CLA, CD66c, CD318 y TSPAN8.

Los experimentos anteriores muestran que estos marcadores se expresan en una muestra de PaCa, ahora se investigó si estos marcadores también se expresan en tejido sano. Por ejemplo, CD318 también se encuentra, además de otros, en tejido de colon, pulmón e hígado. Por lo tanto, el uso de CD318 como marcador único para dirigir las células T con CAR conduciría muy probablemente a una toxicidad fuera del tumor en el objetivo en los tejidos indicados.

En consecuencia, se analizaron los datos de los experimentos previos para encontrar marcadores que muestren una expresión en el mismo espécimen de carcinoma pancreático pero que no muestren una expresión en el mismo espécimen de tejido sano. Se podrían identificar varias combinaciones, como se muestra en la Fig. 6 a - c, mediante comparación visual de imágenes o análisis bioinformático. La comparación visual significa que si dos imágenes muestran sustancialmente el mismo patrón de expresión de dos conjugados diferentes, los marcadores respectivos se expresan sustancialmente en las mismas células. Por otro lado, si dos imágenes muestran patrones de expresión diferentes para dos conjugados diferentes, los marcadores respectivos no se expresan en las mismas células. Por ejemplo, CD318 y CLA no muestran una expresión combinada en muestras de tejido sano.

Finalmente, los candidatos diana resultantes se probaron en una matriz de muestras de varios pacientes con 12 muestras de PaCa diferentes y 1 muestra de ProCa para evaluar la amplitud de la aplicabilidad de estas combinaciones de marcadores. Aquí se demostró que los marcadores se coexpresan en la mayoría de los cánceres de páncreas.

- 5 En conjunto, CLA, CD66c, CD318 y TSPAN8 se identificaron como candidatos para un enfoque de células CAR T para erradicar un cáncer de páncreas con un riesgo mínimo de afectar el tejido sano.

Ejemplo 2: Identificación de combinaciones de conjugados que comprenden un resto fluorescente y un resto que reconoce antígenos que en combinación permiten discriminar entre células de carcinoma de ovario (OvCa) y células que no son OvCa.

- 10 Se cortaron resecciones de carcinoma de ovario seroso de alto grado recién congeladas y se fijaron con acetona. Se realizó una selección utilizando una nueva plataforma de imágenes de alto contenido que permite la obtención de imágenes de fluorescencia cíclica completamente automatizada de muestras biológicas individuales. La tinción secuencial de dos muestras de OvCa con 20 restos de reconocimiento de antígenos conjugados con un resto fluorescente reveló la expresión de varios antígenos. Además de EpCAM (CD326), que es un marcador bien conocido para tejidos epiteliales y carcinomas humanos, estos fueron, por ejemplo, FOLR1, CD227 y CD340 (Fig. 7).

- 15 Los candidatos diana CD326 FOLR1, CD227 y CD340 se validaron mediante el procedimiento de tinción/imagen/destinción mediante la comparación de sus niveles de expresión en dos muestras independientes de resección de carcinoma de ovario seroso de alto grado, así como muestras de tejido humano sano (riñón, pulmón, corazón, piel y colon) (Fig. 8a) y en una tercera muestra independiente de resección de carcinoma seroso de ovario de alto grado, así como muestras de tejido humano sano (hígado, páncreas, glándula tiroides y glándula pituitaria) (Fig. 8b).

- 25 El análisis de datos y otras tinciones conjuntas revelaron que, si bien los cuatro marcadores indicados se expresan en muestras de OvCa, también muestran expresión en tejido sano. Sin embargo, se encontró que la expresión en tejido sano era al menos parcialmente discriminativa, lo que abrió la posibilidad de combinar dos o más marcadores para obtener un marcaje selectivo de células OvCa. Por ejemplo, tanto CD227 como FOLR1 mostraron una expresión en la mayoría de las células OvCa. Mientras que CD227 mostró una expresión pronunciada adicional en hígado, pulmón y páncreas, FOLR1 mostró una expresión notable en riñón, pulmón y piel. Al combinar ambos marcadores e interrogar una coexpresión celular, se encontró que ninguno de los tejidos sanos mencionados anteriormente mostraba una coexpresión celular en una proporción sustancial de células. Por lo tanto, la combinación de CD227 y FOLR1 presenta una opción para erradicar las células OvCa con CAR T que solo se activan cuando se unen los antígenos CD227 y FOLR1 (células AND CAR T) sin toxicidad en el objetivo fuera del tumor o muy reducida. Por otro lado, al realizar un análisis similar al descrito anteriormente, se encontró que, por ejemplo, la combinación de FOLR1 y Podoplanina abre la posibilidad de un tratamiento de OvCa con células NOT CAR T. Mientras que FOLR1 se expresa en las células OvCa, pero también en los riñones, los pulmones y la piel, la podoplanina no muestra una coexpresión celular con FOLR1 en las células OvCa, pero se expresa fuertemente en los riñones, los pulmones y la piel.

- 35 Por lo tanto, el uso de células T con CAR que se activan con la detección de FOLR1 pero se desactivan o inhiben con la detección de podoplanina debería resultar en una destrucción eficaz de las células OvCa sin afectar a las células sanas porque no se expresa FOLR1 o se expresa podoplanina.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para proporcionar una célula que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico para uno o más antígenos diana expuestos en células tumorales caracterizado por proporcionar una muestra de células que comprende células tumorales y no tumorales y repitiendo las etapas de
- 5 - poner en contacto el tejido celular con un conjugado que comprende un resto fluorescente y un resto que reconoce el antígeno
- eliminar el conjugado no unido del tejido celular y detectar las células unidas al conjugado por la radiación de fluorescencia emitida por los restos fluorescentes de los primeros conjugados
- 10 - eliminar la fluorescencia emitida por los restos fluorescentes de los conjugados con conjugados que comprenden un resto fluorescente y un antígeno reconociendo restos reconociendo diferentes antígenos
- hasta identificar al menos dos conjugados provistos de antígenos que reconocen restos que reconocen diferentes antígenos, lo que permite en combinación discriminar entre células tumorales y células no tumorales y
- proporcionar células con al menos dos restos de reconocimiento de antígeno identificados como receptor de antígeno quimérico (CAR).
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la célula que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) se selecciona del grupo que consiste en células T, células NK o células diseñadas para destruir otras células cuando se activan mediante la unión de la otra célula.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que los al menos dos restos que reconocen antígenos se proporcionan como tipo AND, OR o NOT.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que los al menos dos restos que reconocen antígenos se proporcionan como tipo ADAPTER.
5. Procedimiento según la reivindicación 4 caracterizado por que la célula está provista con al menos dos restos de reconocimiento de antígeno identificadas como receptor de antígeno quimérico (CAR) proporcionando una célula que comprende biotina como resto de reconocimiento de antígeno de un receptor de antígeno quimérico (CAR) y proporcionando conjugados de al menos dos restos de reconocimiento de antígeno identificadas con un resto anti-biotina y conjugando dichos conjugados con dichas células.
- 25 6. Procedimiento según la reivindicación 4 caracterizado por que la célula está provista con al menos dos restos de reconocimiento de antígeno identificadas como receptor de antígeno quimérico (CAR) al proporcionar una célula que comprende biotina como resto de reconocimiento de antígeno de un primer receptor de antígeno quimérico (CAR) y un segundo epítopo como resto de reconocimiento de antígeno de un segundo receptor de antígeno quimérico (CAR) y proporcionar conjugados de al menos dos restos de reconocimiento de antígeno identificadas con una resto anti-biotina y una segunda resto que conjuga dichos conjugados con dichas células.
- 30 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que los al menos dos conjugados provistos de restos que reconocen antígenos se unen al menos al 20% de las células tumorales y menos del 5% de las células no tumorales.
- 35 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que los al menos dos conjugados provistos de restos que reconocen el antígeno se unen al menos 10 veces más células tumorales que células no tumorales de la muestra de células.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que la radiación de fluorescencia emitida por los restos fluorescentes se elimina mediante la degradación enzimática de los conjugados.
- 40 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que la radiación de fluorescencia emitida por los restos fluorescentes se elimina por la radiación.

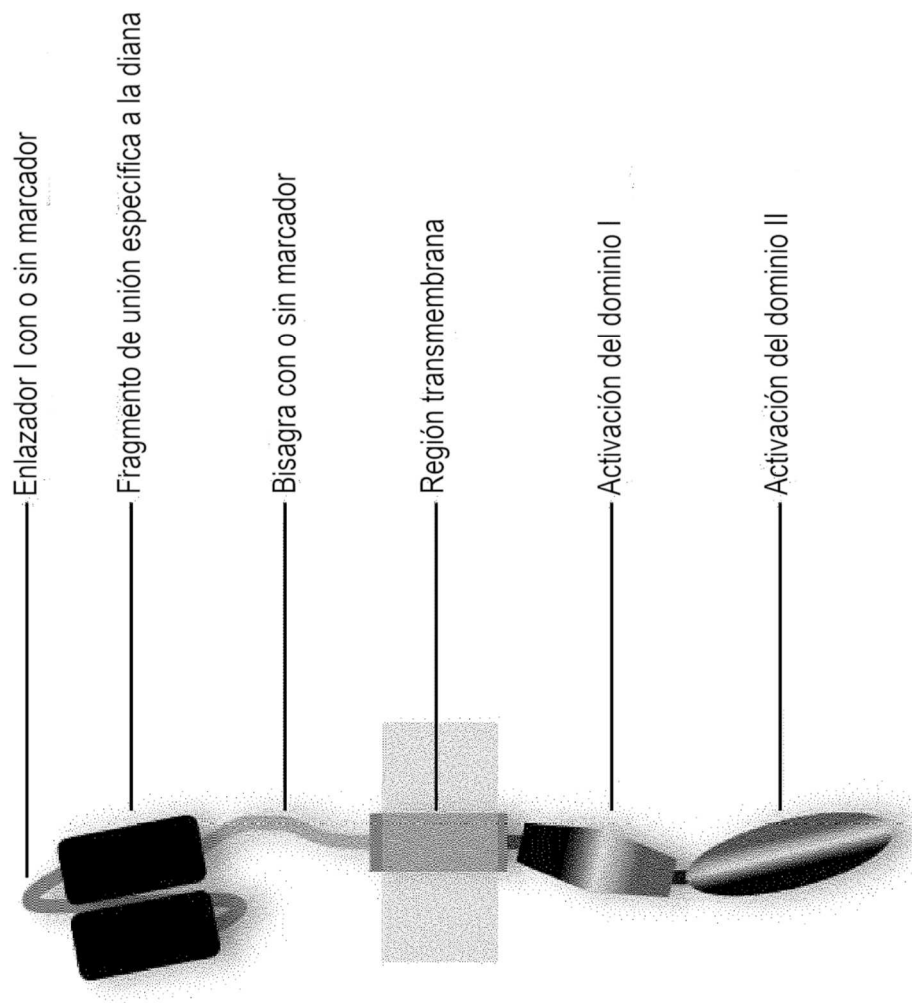


Fig. 1

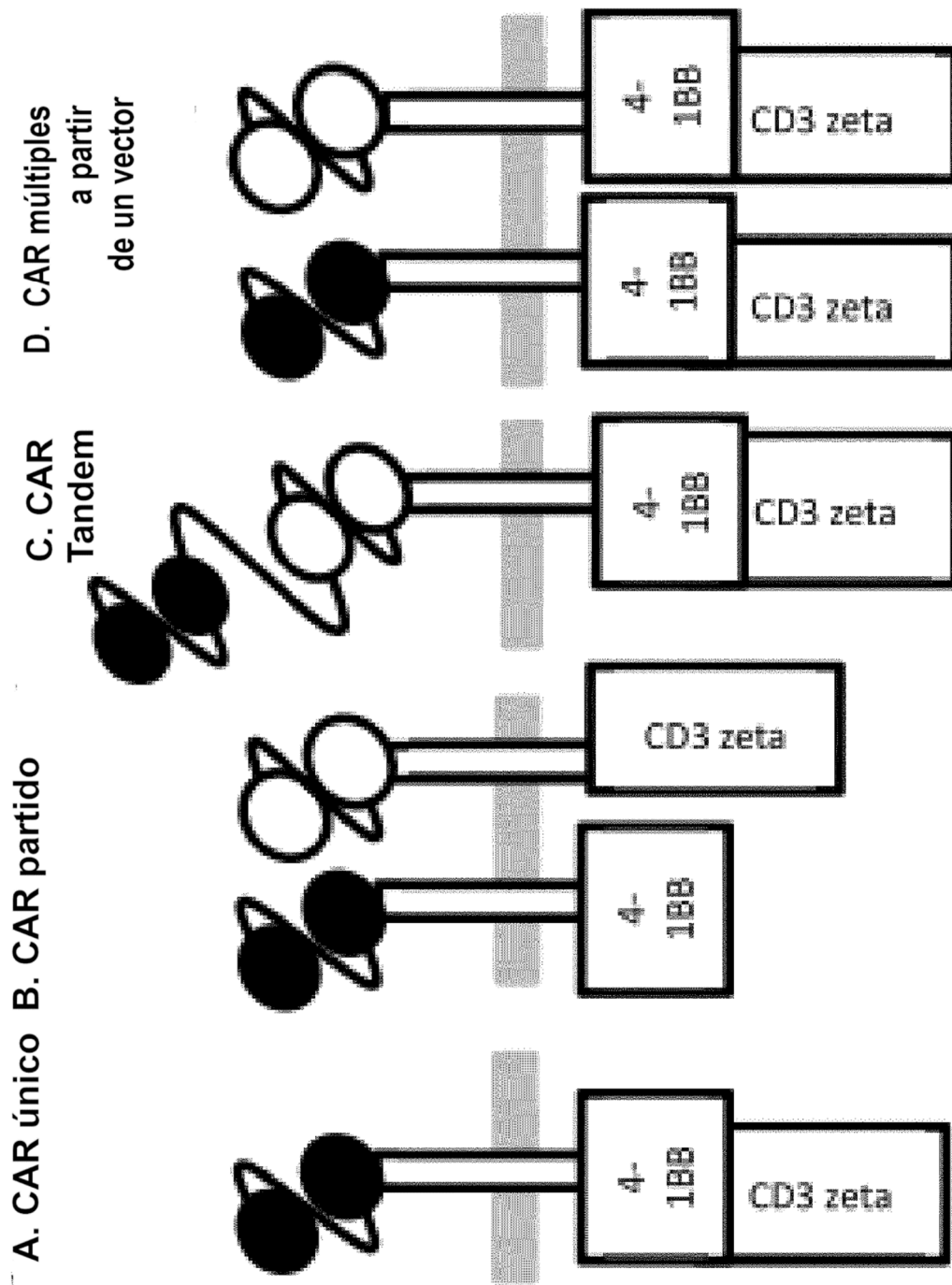


Fig. 2

Celda CAR AND

expresión **mutuamente exclusiva**
de A y B en tejido sano

expresión de A
y B en tumor

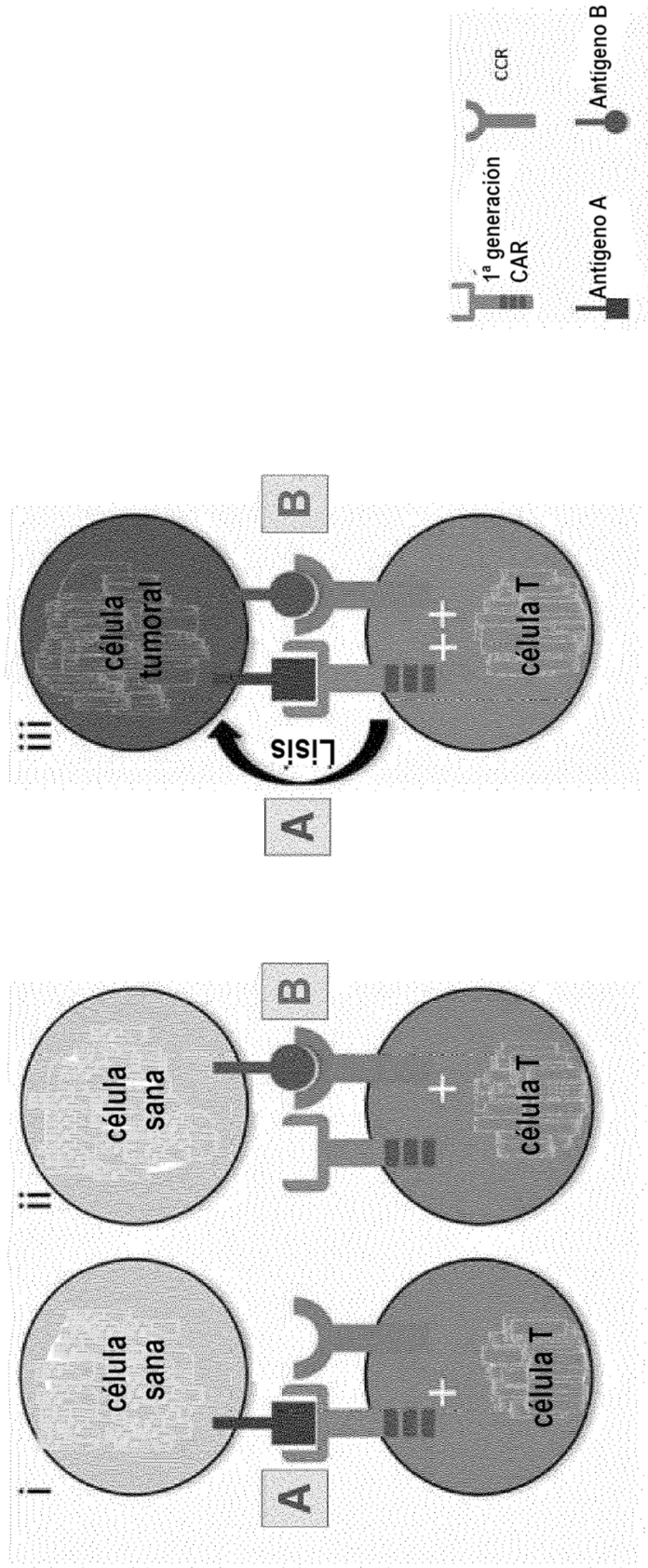


Fig. 3

Celda CAR NOT

B debe expresarse en los
mismos tejidos normales que A,
pero no en el tumor

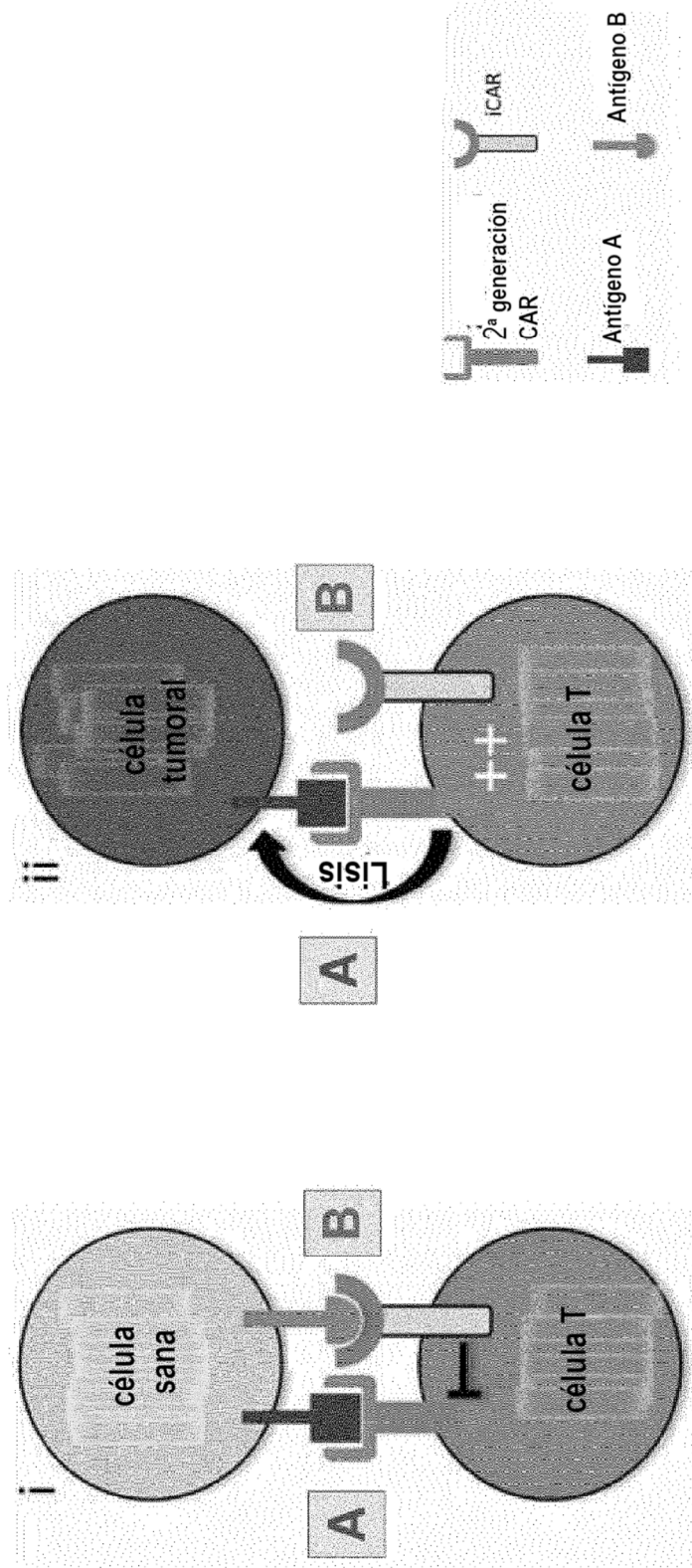
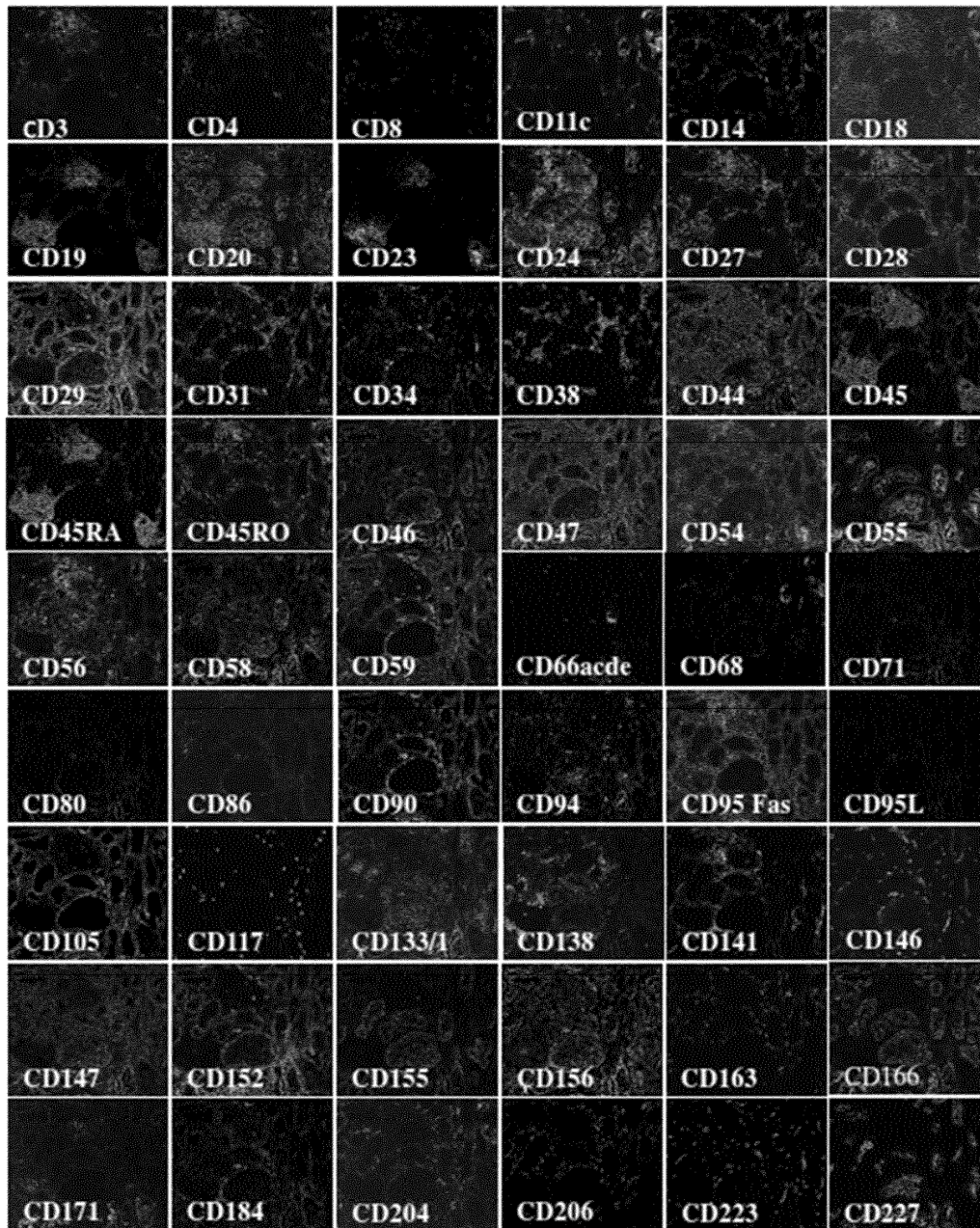


Fig. 4

Fig 5a



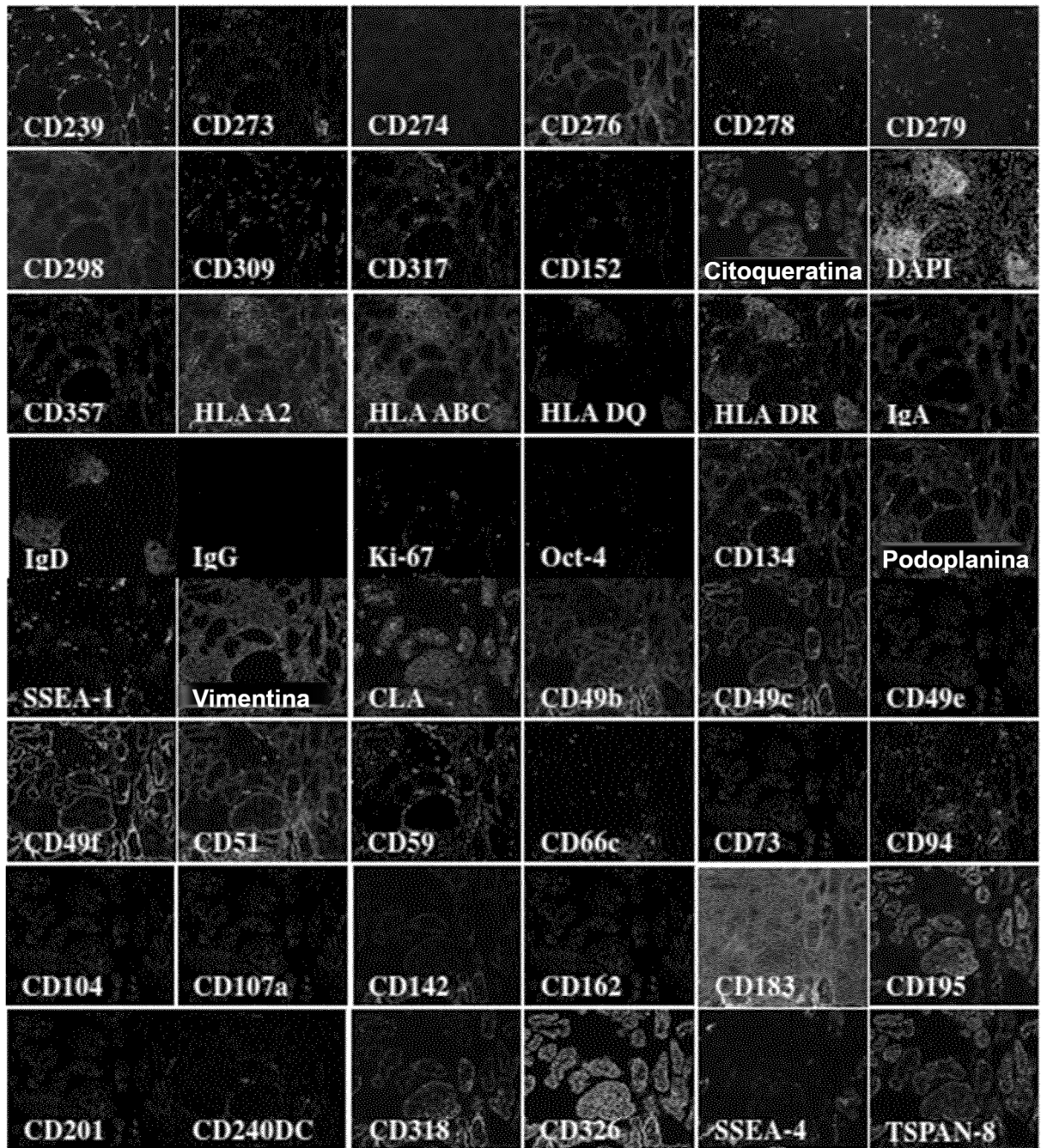


Fig. 5b

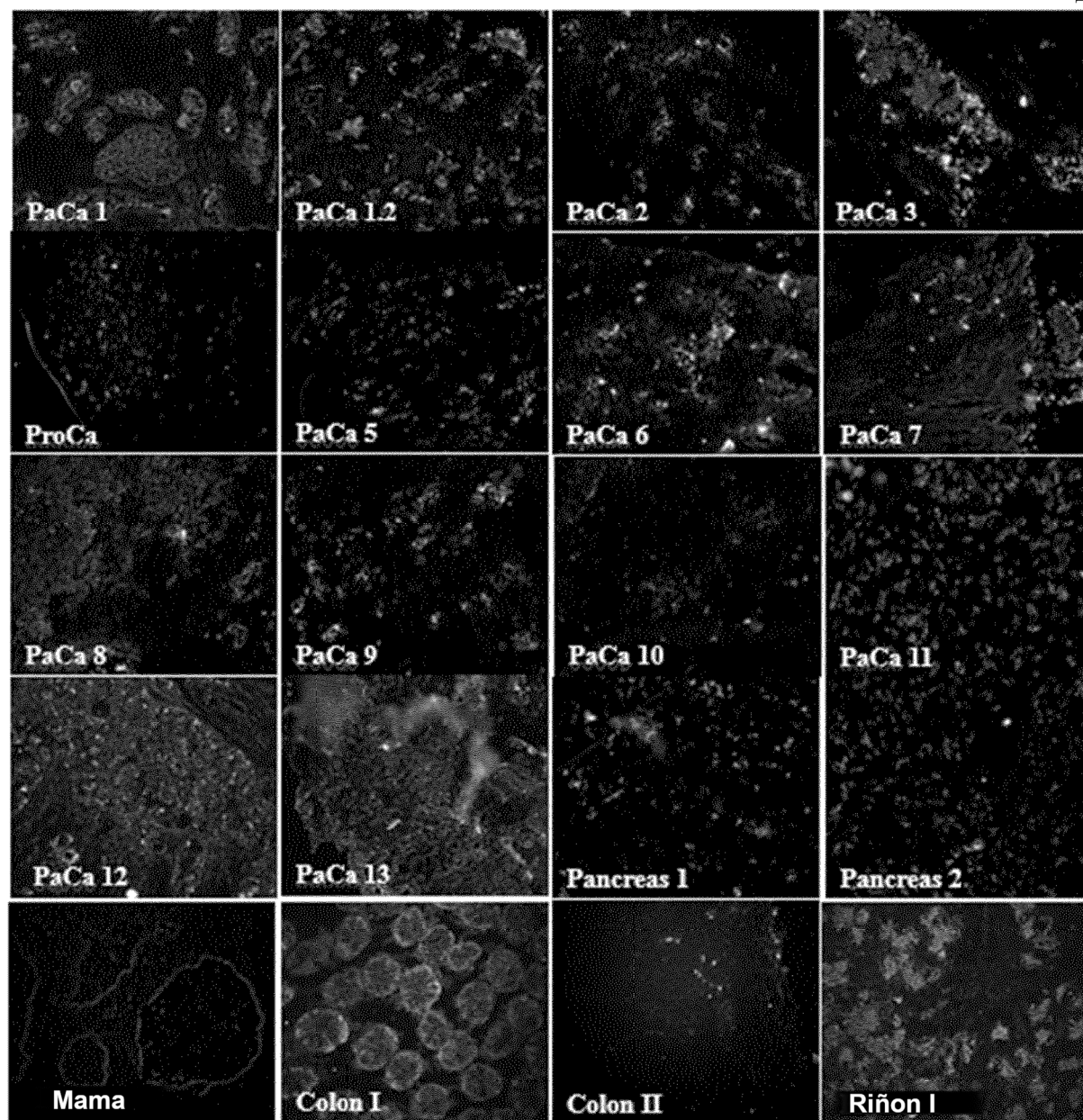


Fig. 6a

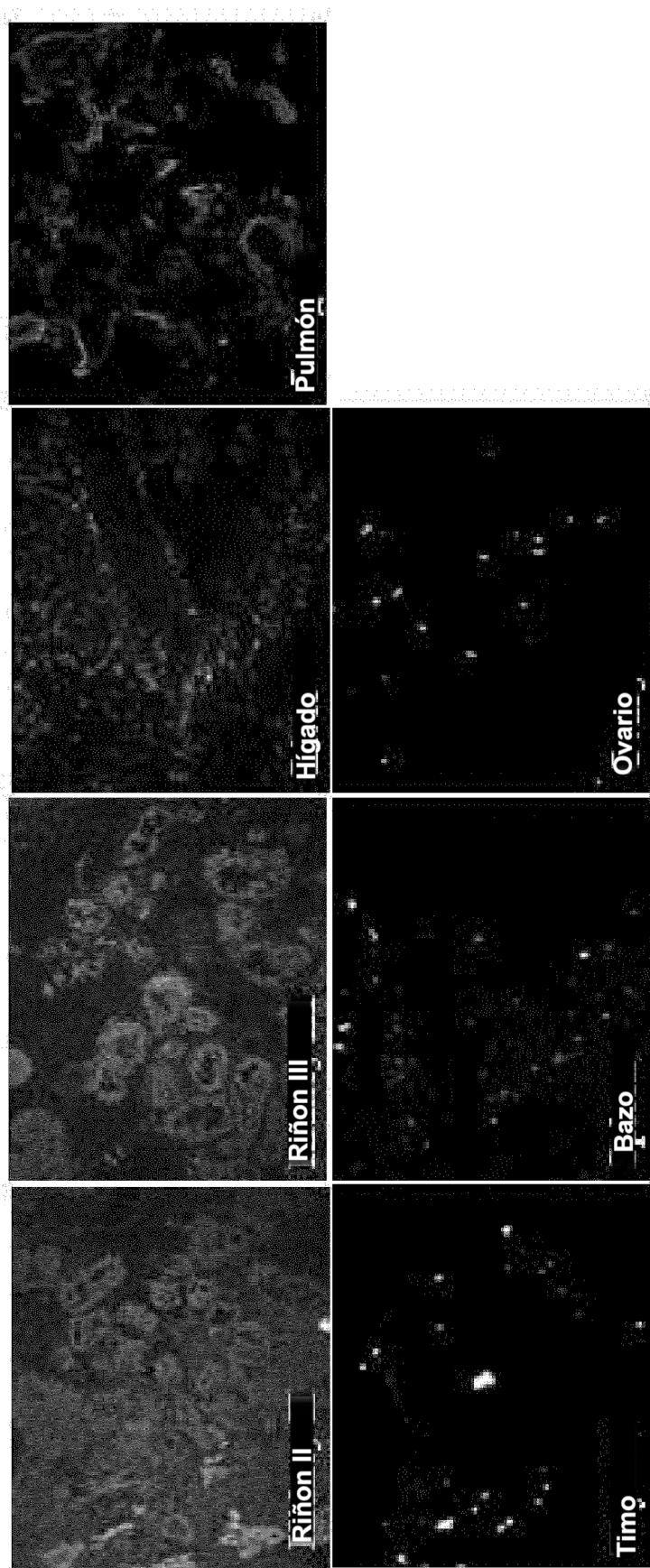


Fig. 6b

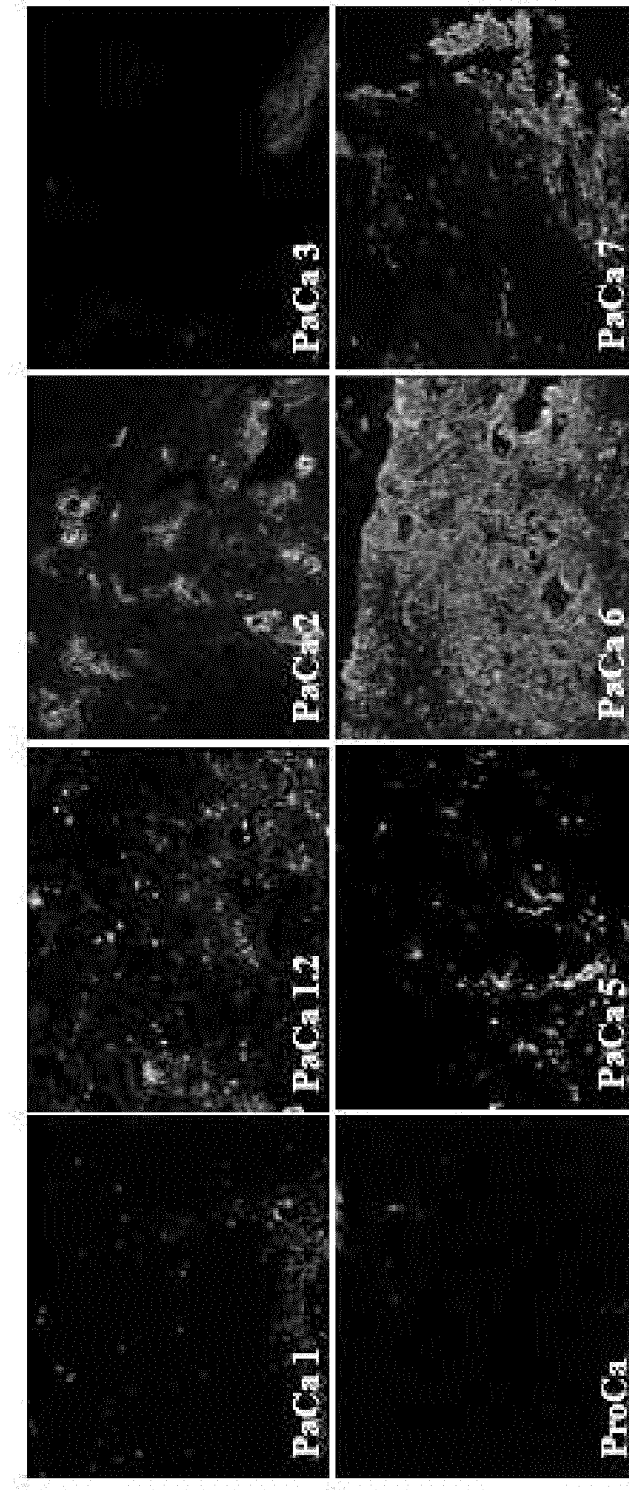


Fig. 6c

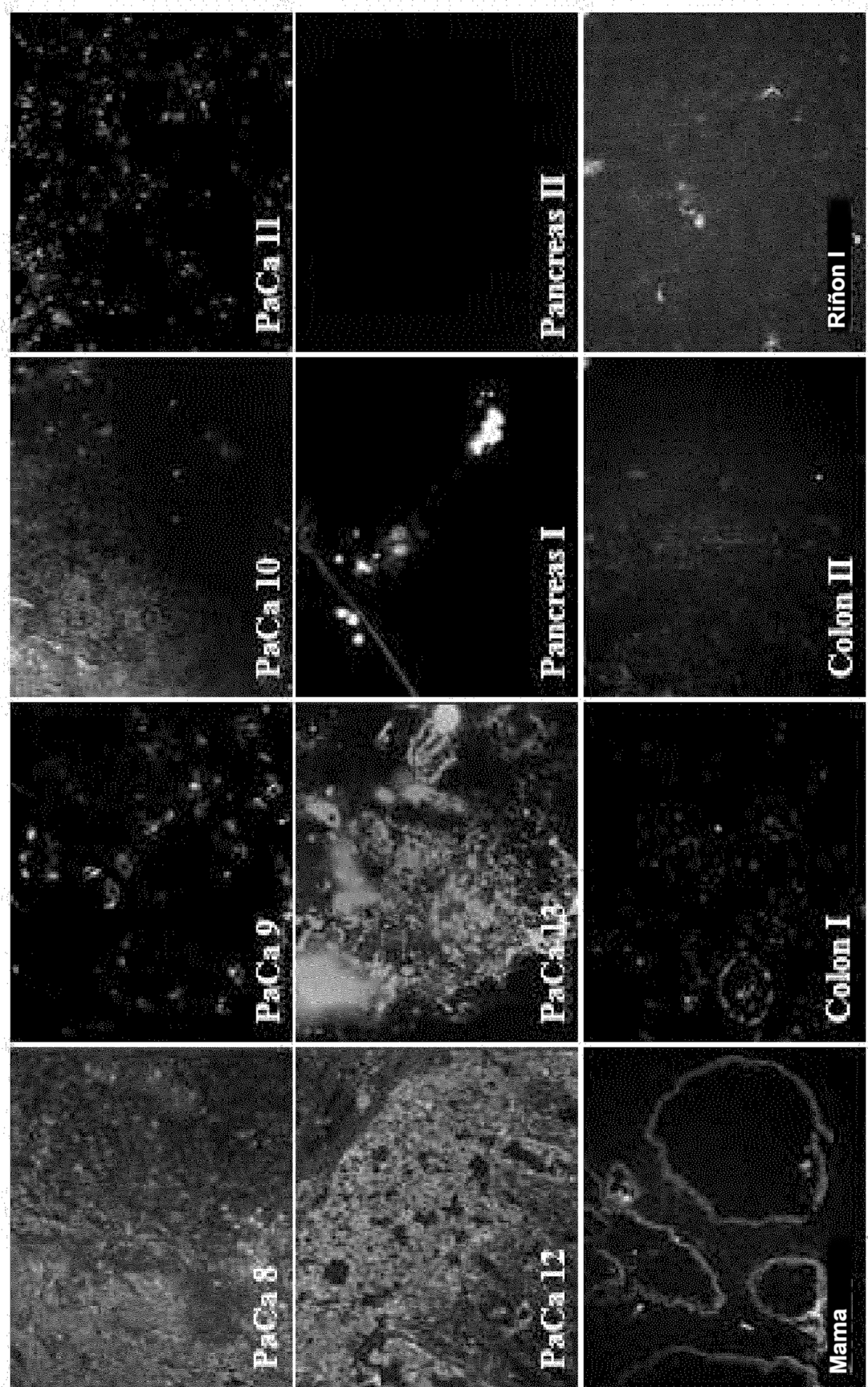


Fig. 6d

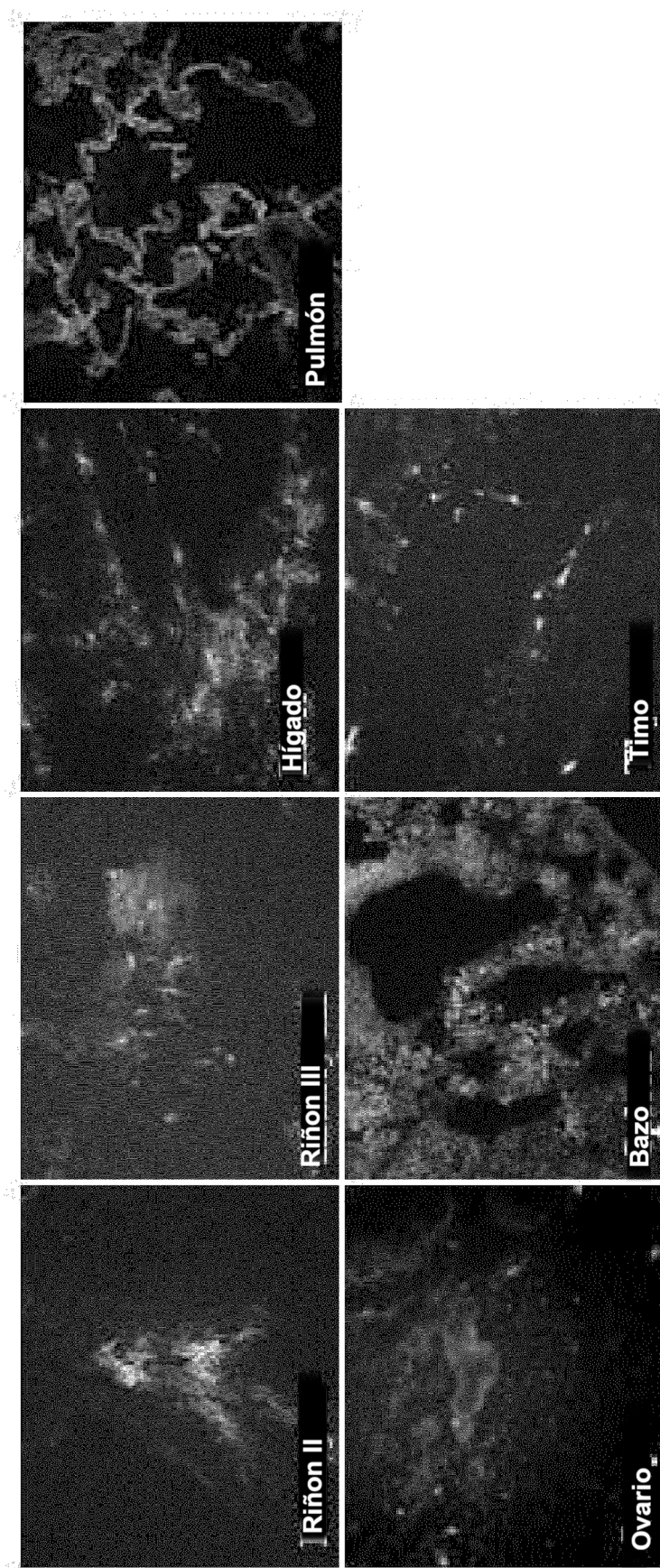


Fig. 6e

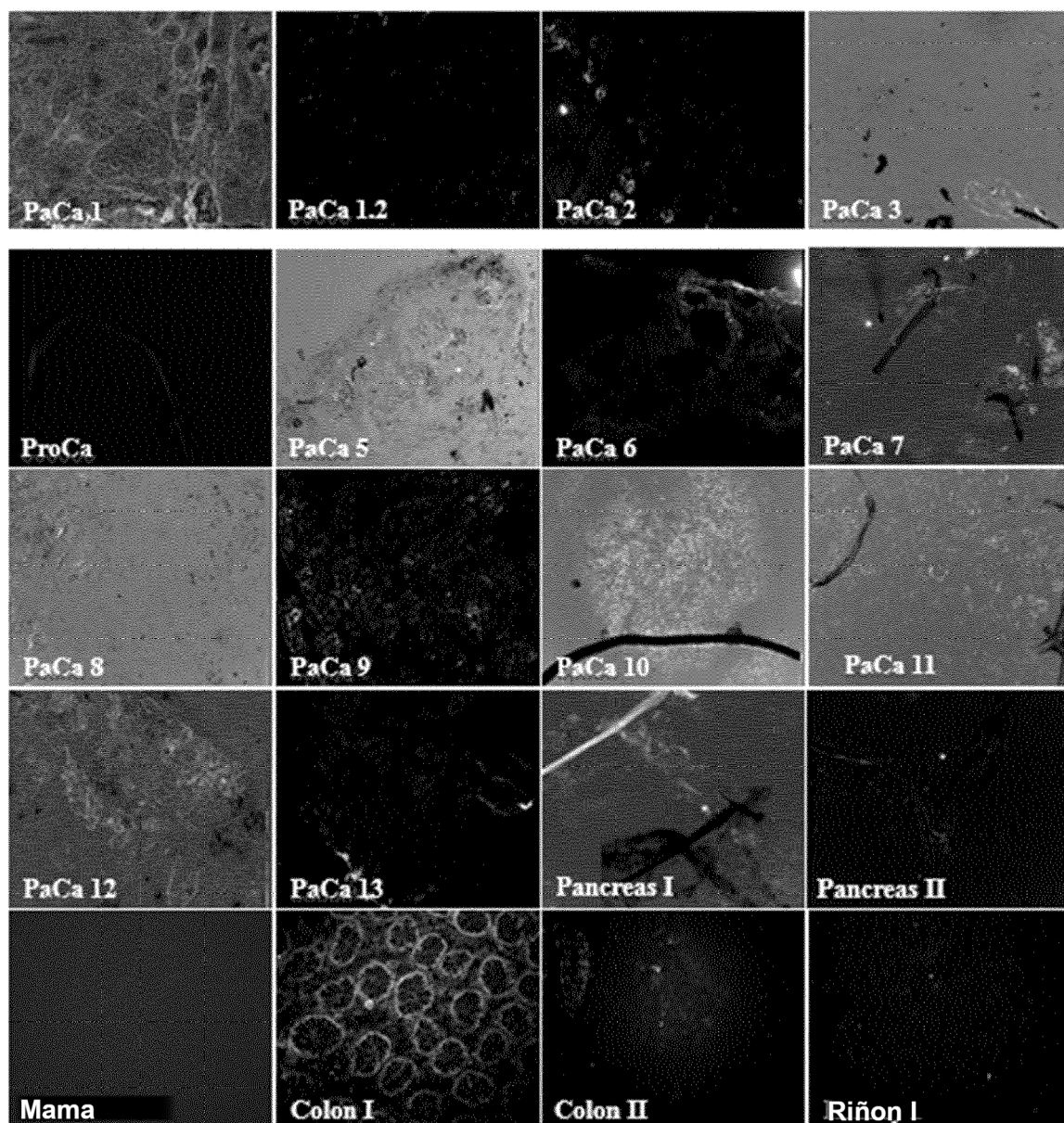


Fig 6f1:expresión de CD318 en tejido adyacente normal PaCa diferente y sano

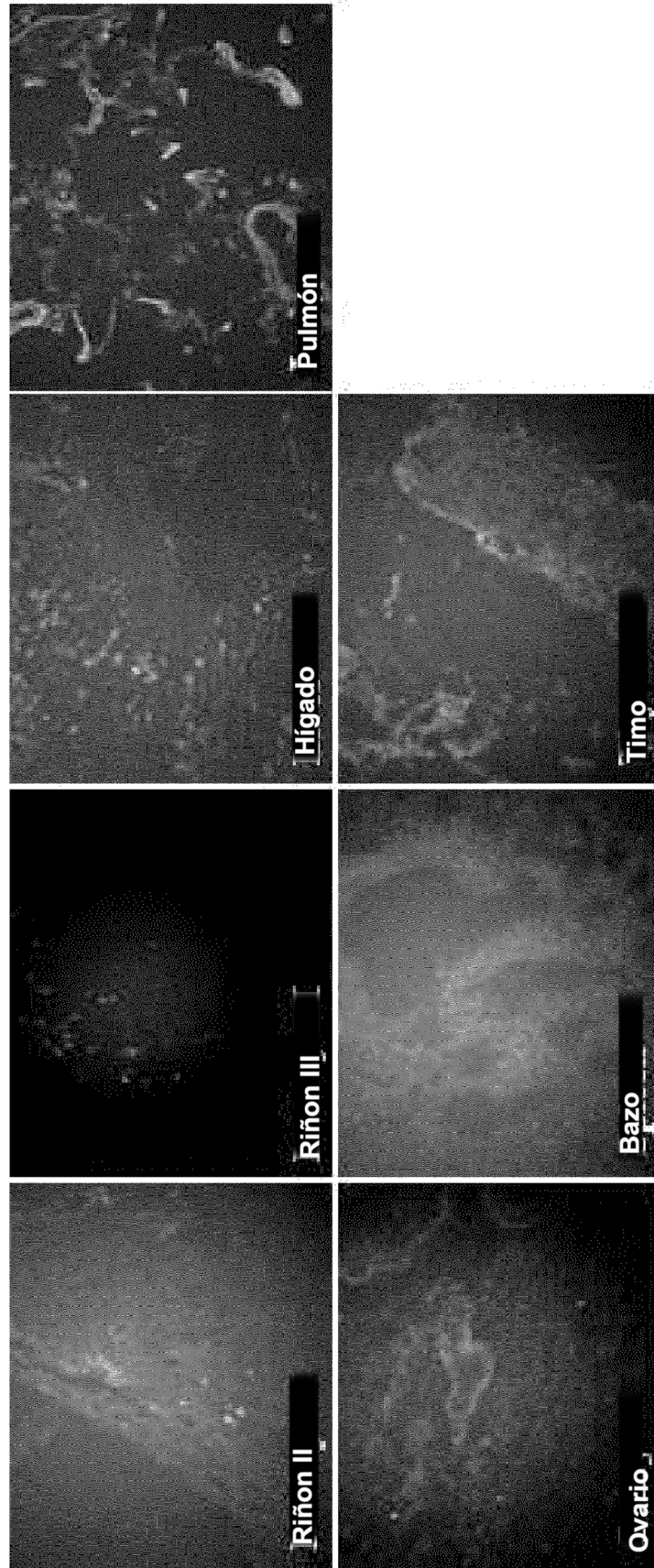


Fig 6f2:expresión de CD318 en tejido adyacente normal PaCa diferente y sano

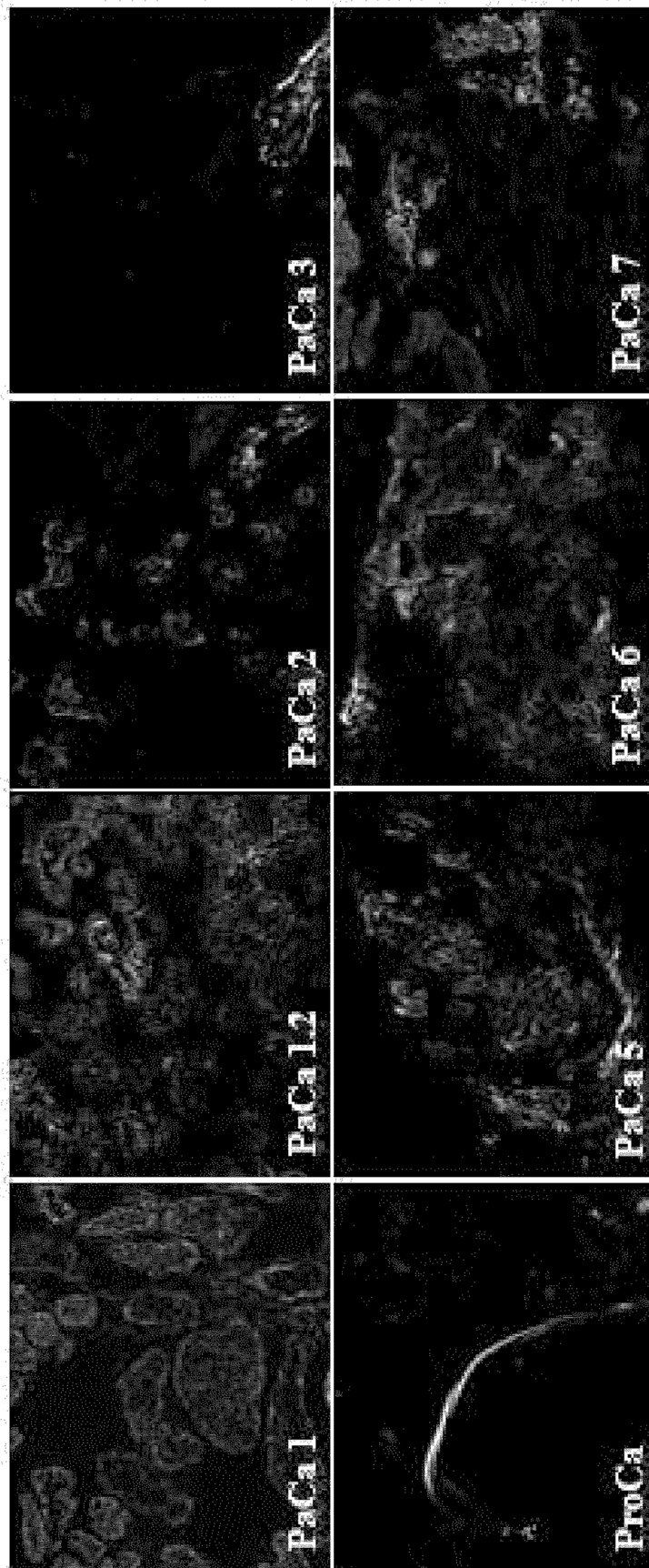


Fig 6g1:expresión de TSPAN-8 en tejido adyacente normal PaCa diferente y sano

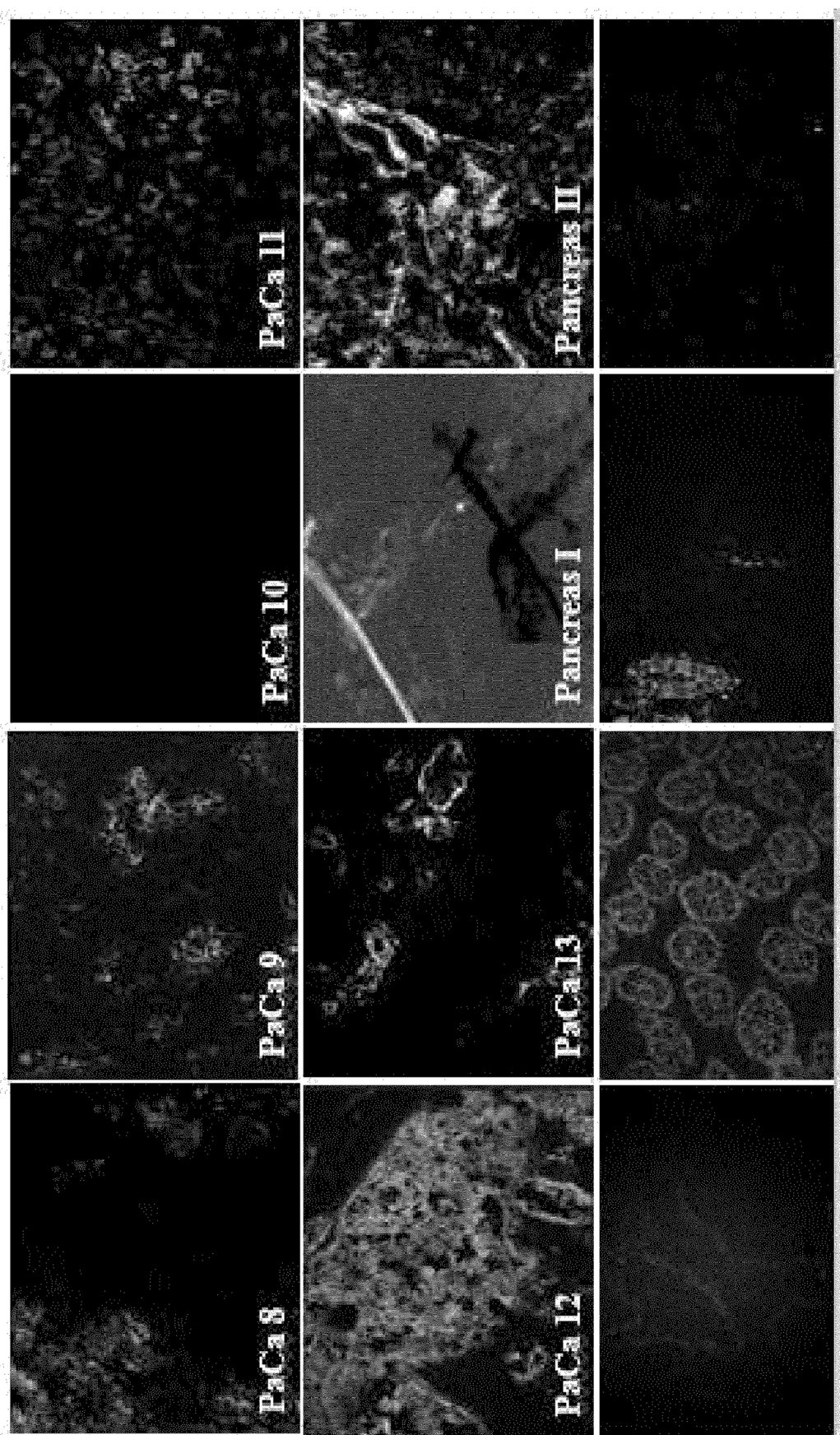


Fig 6g2:expresión de TSPAN-8 en tejido adyacente normal PaCa diferente y sano

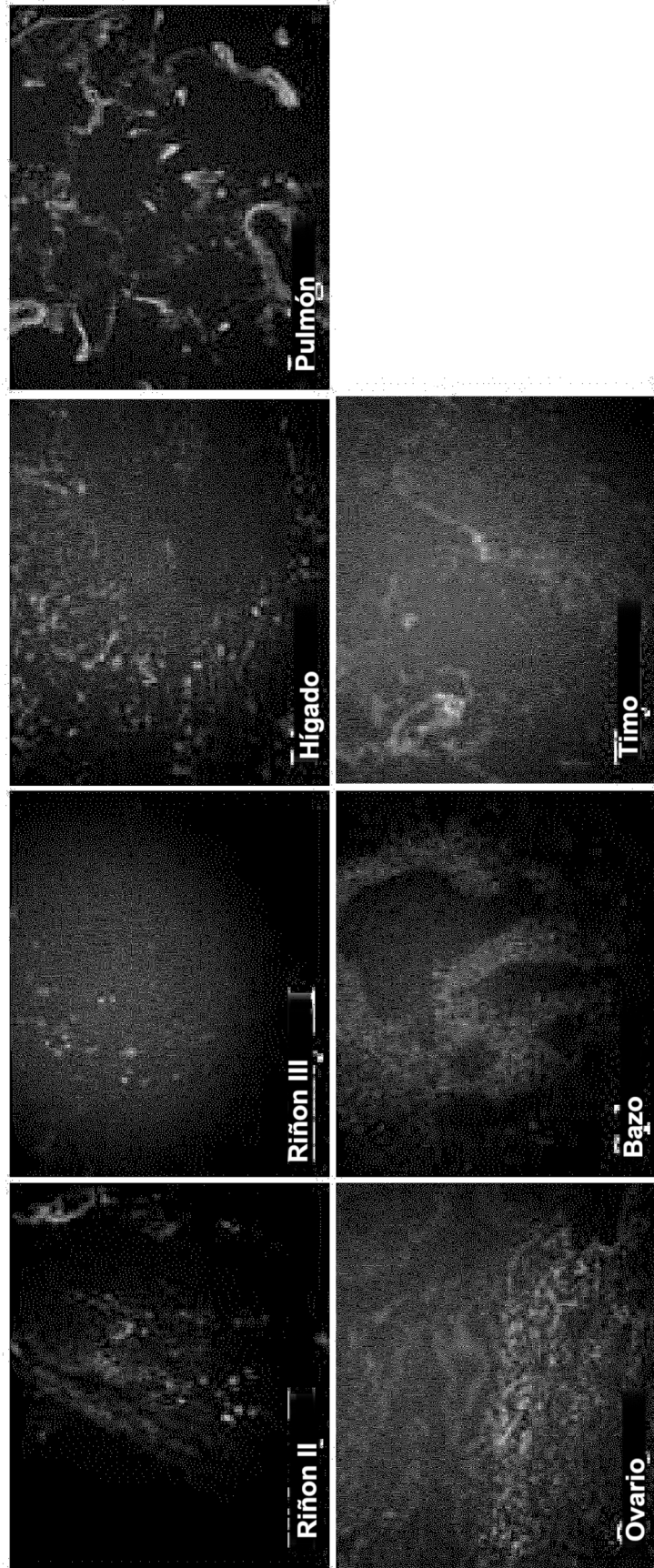


Fig 6g3:expresión de TSPAN-8 en tejido adyacente normal PaCa diferente y sano

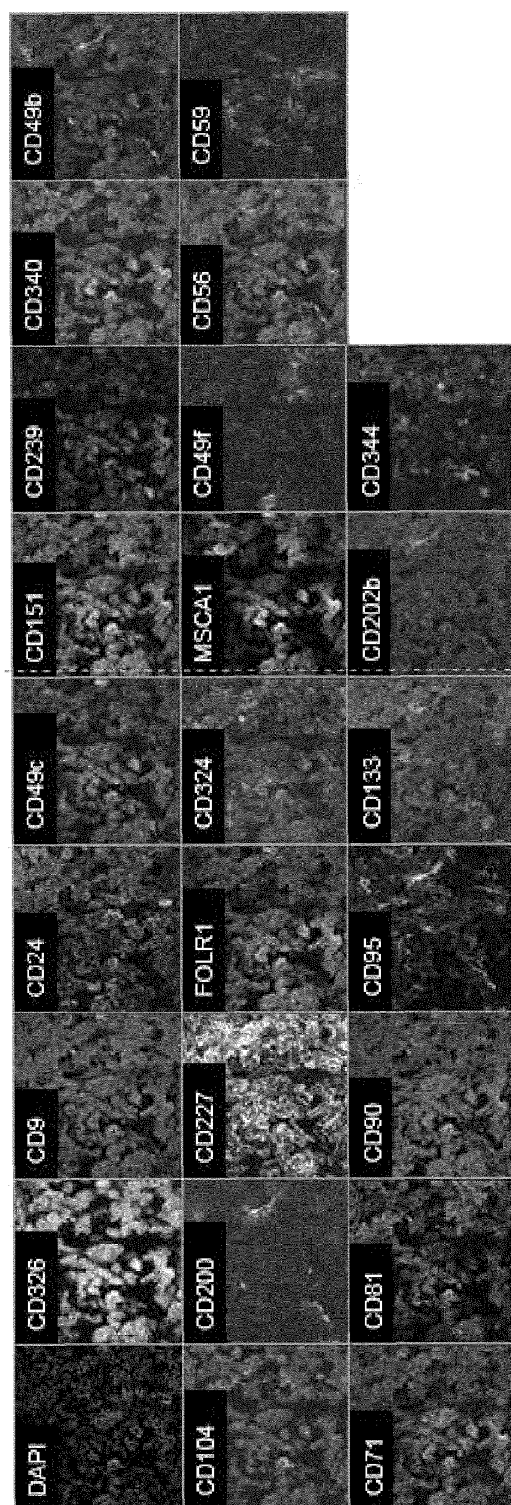


Fig. 7 A

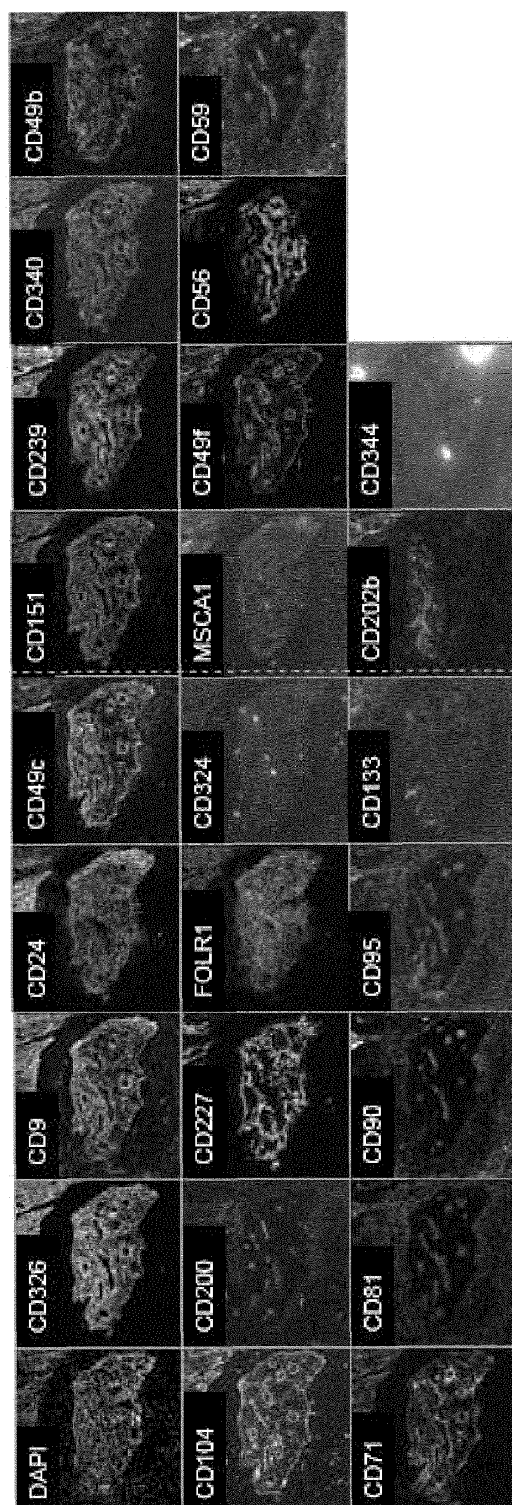


Fig. 7b

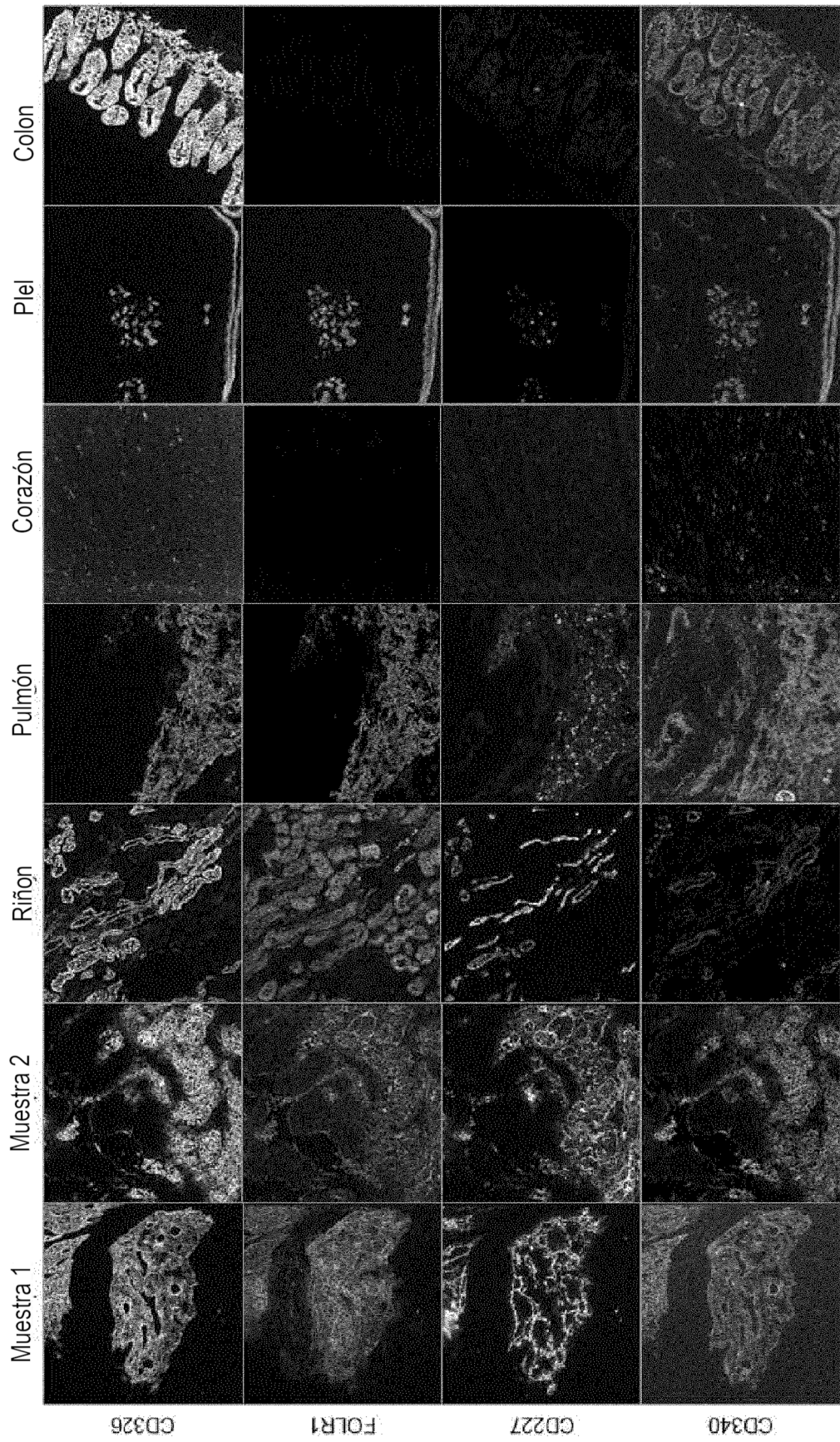


Fig. 8a (Cáncer de ovario)

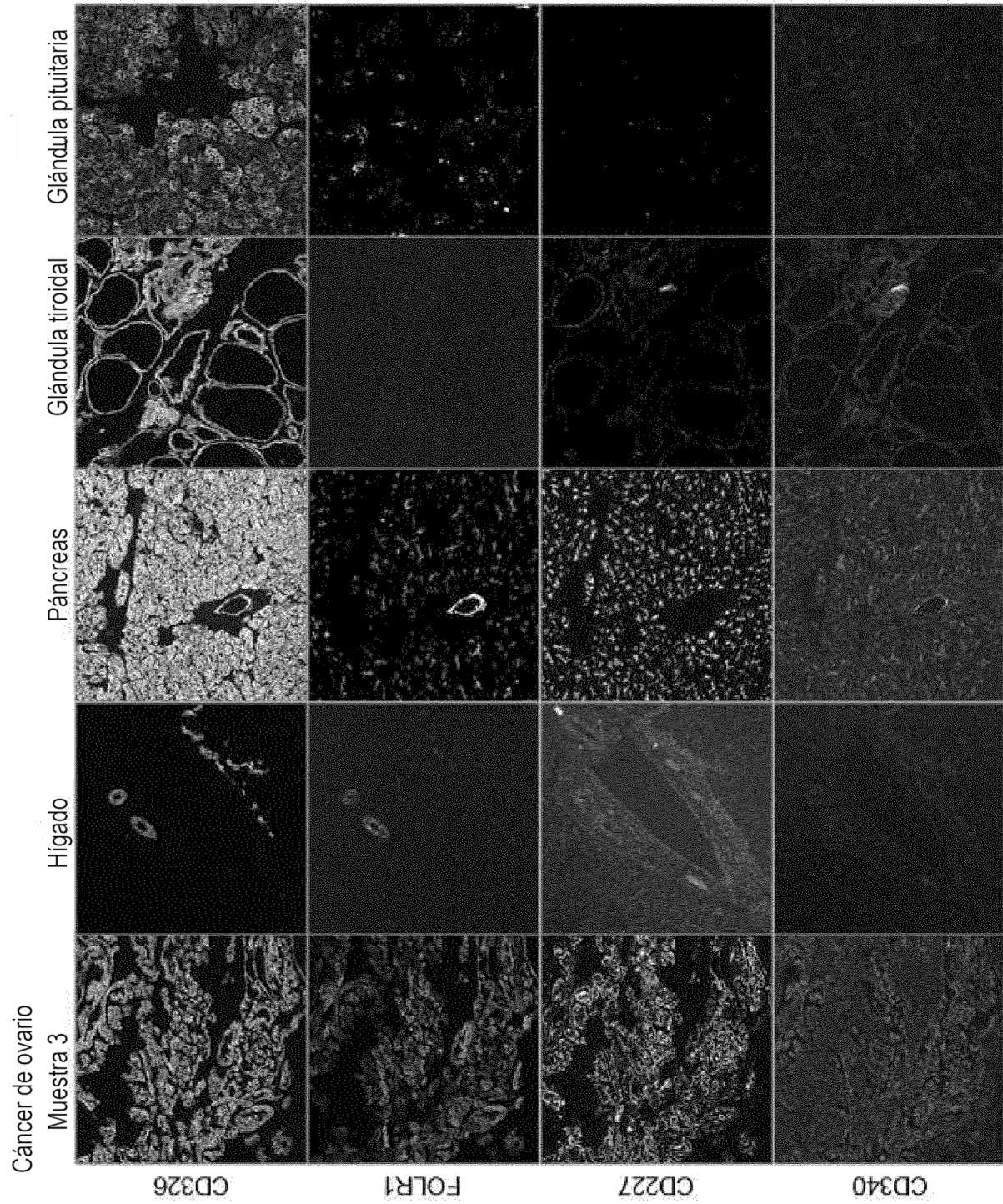


Fig. 8b