(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 932 184**

(51) Int. CI.:

A61K 35/17 (2015.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/536 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2015 PCT/EP2015/077286**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2016 WO16079333**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2015 E 15800768 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2022 EP 3220928**

(54) Título: **Un método para obtener una preparación enriquecida en células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos**

(30) Prioridad:

20.11.2014 EP 14194125

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.01.2023

(73) Titular/es:

UMC UTRECHT HOLDING B.V. (100.0%)
Heidelberglaan 8
3584 CS Utrecht, NL

(72) Inventor/es:

KUBALL, JÜRGEN HERBERT ERNST

(74) Agente/Representante:

SUGRAÑES, S.L.P.

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

Un método para obtener una preparación enriquecida en células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos

Campo de la divulgación

La divulgación es en el campo de la medicina. En particular en el campo de la terapia génica. Se refiere a la inmunología y la terapia celular para el tratamiento de cáncer. La divulgación se refiere además a métodos para el enriquecimiento de células T modificadas por ingeniería genética y al uso de células T modificadas por ingeniería genética en tratamientos médicos.

Antecedentes de la técnica

La transferencia adoptiva de células T con especificidad antitumoral modificada por ingeniería genética o especificidad anti-patógeno está en desarrollo. En tales estrategias, un receptor inmunitario exógeno tal como un receptor de células T alfa beta, o un receptor de células T gamma delta o un receptor de antígeno quimérico que tiene una especificidad antitumoral particular, o una especificidad anti-patógeno particular se transfiere a células T autólogas de un paciente, o, por ejemplo, en caso de un trasplante alogénico de células madre en un paciente, en las células T alogénicas correspondientes. Por ejemplo, un paciente leucémico que se somete a un trasplante de células madre sanguíneas también tendrá agotamiento de linfocitos durante el tratamiento. Por tanto, dicho paciente también puede beneficiarse de, por ejemplo, la infusión de células T de donante que han sido modificadas por ingeniería genética para expresar un receptor de células T antileucémico específico.

Aunque los ensayos clínicos han establecido el valor de la transferencia adoptiva de células modificadas por ingeniería genética con TCR (T-cell receptor en inglés) en pacientes con cáncer, el beneficio clínico de tales estrategias generalmente se observa solo en una parte de los pacientes. Una explicación de la efectividad limitada observada de las células T modificadas por ingeniería genética con TCR es una expresión superficial subóptima de los TCR terapéuticos provocada por la competencia por los componentes CD3 entre los TCR recién introducidos y los endógenos (Provasi *et al.* Nat Med. mayo de 2012;18(5):807-15). Por otra parte, la aplicación de tales estrategias en un entorno alogénico, por ejemplo, trasplante alogénico de células madre, se ve obstaculizada por graves problemas de seguridad, ya que las células T no modificadas por ingeniería genética que expresan receptores endógenos de células T alfa beta pueden inducir efectos secundarios no deseados tales como, por ejemplo, enfermedad de injerto contra huésped en un entorno de trasplante alogénico de células madre. Por tanto, se han desarrollado estrategias para seleccionar células T modificadas por ingeniería genética que se centran en una selección positiva de células T modificadas por ingeniería genética. Las estrategias que existen en la actualidad apuntan a incluir marcadores genéticos sustitutos tales como, por ejemplo, un gen de neomicina o, por ejemplo, una proteína fluorescente o algún otro gen adicional que permita una selección positiva de células transducidas o transfectadas. Sin embargo, tales estrategias tienen más problemas de seguridad porque requieren la inclusión de genes extraños generalmente grandes que pueden ser inmunogénicos además de la transferencia adoptiva de un receptor inmunitario exógeno con una especificidad deseada.

Además, también se ha reconocido en la técnica que debido al hecho de que las células modificadas por ingeniería genética se infunden en los pacientes, que puede ser beneficioso eliminar selectivamente estas células de un paciente en caso de un acontecimiento adverso. Por tanto, las células T modificadas por ingeniería genética a menudo también comprenden, además del receptor inmunitario exógeno, genes adicionales que permiten eliminar selectivamente las células T modificadas por ingeniería genética. Dichos genes incluyen, por ejemplo, genes suicidas que, tras la administración de un agente al paciente, destruyen selectivamente las células con el gen suicida tal como HSV-TK (revisado en Bondanza *et al.*, Blood 107, 1828-1836 (2006).

Por tanto, en la técnica, las estrategias para la modificación por ingeniería genética de células T y para su uso en sujetos, tales como en el tratamiento de seres humanos, se han centrado en incluir genes adicionales en células T modificadas por ingeniería genética que permitan la selección de las células modificadas por ingeniería genética para su uso en los sujetos y/o que permitan el agotamiento de las células T modificadas por ingeniería genética de sujetos que están siendo tratados con dichas células T modificadas por ingeniería genética.

Sumario de la invención

La invención es como se expone en las reivindicaciones.

Divulgación adicional

La divulgación actual proporciona ahora métodos adicionales que permiten el enriquecimiento de células T modificadas por ingeniería genética sin requerir la adición de ningún gen adicional. También, el método permite seleccionar las células T modificadas por ingeniería genética que no requiere ninguna interferencia de las células T modificadas por ingeniería genética. La célula T modificada por ingeniería genética puede permanecer intacta.

Los presentes inventores se dieron cuenta de que al seleccionar células T modificadas por ingeniería genética mediante métodos de selección positiva, por ejemplo, usando un marcador de selección, aún así, pueden existir subpoblaciones de células T modificadas por ingeniería genética que expresan niveles funcionales de receptores de células T alfa beta endógenos además de expresar el receptor inmunitario exógeno de la especificidad deseada y el marcador de selección separado. Dichas subpoblaciones se seleccionarán con cualquier estrategia de selección positiva y pueden limitar la eficacia terapéutica y la seguridad de los productos de células modificadas por ingeniería genética. No se proporcionan métodos en la técnica anterior que permitan eliminar dichas subpoblaciones.

Adicionalmente, los métodos de selección positiva para seleccionar células T modificadas por ingeniería genética usando, por ejemplo, un anticuerpo que se une al receptor inmunitario exógeno puede inducir la apoptosis en un número sustancial de células transducidas. Además, los métodos de selección positiva que incluyen marcadores de selección requieren la adición de genes que pueden inducir una respuesta inmunitaria no deseada, ya que dichos marcadores de selección normalmente no son del hospedador (por ejemplo, no humanos) y, por lo tanto, pueden reconocerse como extraños, dando como resultado la eliminación de las células transducidas por el hospedador.

Los presentes inventores por lo tanto se propusieron desarrollar una estrategia novedosa que, además de seleccionar las células T modificadas por ingeniería genética, también pueda eliminar subpoblaciones no deseadas como se describe anteriormente, no requiera que se incluya ningún gen adicional en la célula T modificada por ingeniería genética excepto el receptor inmunitario exógeno y que permita que las células T modificadas por ingeniería genética permanezcan intactas.

Los métodos de la divulgación para enriquecer las células T modificadas por ingeniería genética, en contraste con cualquier método del estado de la técnica anterior, implican el uso de una etapa de selección negativa. A partir de una mezcla de células T que comprende células T modificadas por ingeniería genética con un receptor inmunitario exógeno y células T no modificadas por ingeniería genética con un receptor de células T alfa beta endógeno, las células T alfa beta no modificadas por ingeniería genética pueden separarse de la mezcla. Dichos métodos también incluyen la separación de cualquier célula T modificada por ingeniería genética que esté comprendida en la mezcla de células T que tengan una expresión subóptima del receptor inmunitario exógeno y que aún puedan tener una cantidad sustancial de receptor de células T alfa beta endógeno expresado. Dicho método también permite que las células T modificadas por ingeniería genética que están incluidas en la mezcla de células T permanezcan intactas, evitando, por ejemplo, la inducción no deseada de apoptosis que puede producirse con un método de selección positivo usando anticuerpos que se unen a las células T modificadas por ingeniería genética.

Dichos métodos comprenden el uso de anticuerpos selectivos que se unen específicamente al receptor endógeno de células T alfa beta. Por tanto, cualquier célula T en la mezcla de células T que comprenda receptores de células T alfa beta endógenos en su superficie celular se separará de la mezcla obteniendo de esta manera una preparación enriquecida de células T modificadas por ingeniería genética con el receptor inmunitario exógeno. Dichos anticuerpos selectivos utilizan diferencias de secuencia entre el receptor de células T alfa beta endógeno y el receptor inmunitario exógeno. Incluso un receptor de linfocitos T alfa beta del mismo origen que los linfocitos T modificados por ingeniería genética puede usarse como un receptor inmunitario exógeno. Todo lo que se requiere es que la secuencia de aminoácidos del receptor de células T alfa beta exógeno correspondiente al sitio de unión del anticuerpo al receptor de células T alfa endógeno se modifique de tal manera que el anticuerpo ya no pueda unirse al mismo. Pueden incluirse otras modificaciones, por ejemplo, para mantener u optimizar la función del receptor de células T, mantener la especificidad y/o introducir el emparejamiento preferible de dos cadenas.

Los anticuerpos selectivos pueden usarse en técnicas de separación tales como MACS, FACS y cromatografía de inmunoafinidad. Las preparaciones enriquecidas en células T modificadas por ingeniería genética obtenidas con la divulgación son particularmente útiles en un tratamiento médico. Dicho tratamiento médico puede ser el tratamiento de un cáncer. Por ejemplo, en el tratamiento de leucemia, un paciente que se somete a un trasplante alogénico de células madre también puede beneficiarse de una infusión de una preparación de células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas, es decir, células T modificadas por ingeniería genética alogénicas, que pueden obtenerse mediante cualquiera de los métodos de la divulgación, y que son células T modificadas por ingeniería genética que se proporcionan con un receptor inmunitario exógeno que tiene especificidad, por ejemplo, por las células leucémicas del paciente. De esta forma, la eliminación de la leucemia puede promoverse adicionalmente en el tratamiento mientras que el riesgo de inducir efectos secundarios no deseados debido a la presencia de células T que expresan receptores de células T alfa beta endógenos puede reducirse sustancialmente o incluso evitarse por completo.

De forma similar, en un aspecto diferente de la divulgación, los linfocitos modificados por ingeniería genética, es decir, las células T modificadas por ingeniería genética (o las células NK modificadas por ingeniería genética, no cubiertas por la invención reivindicada) también pueden estar provistas de un receptor inmunitario exógeno, por ejemplo, un CAR o un receptor de células T alfa beta modificado por ingeniería genética o un receptor de células T gamma delta (modificado por ingeniería genética), de tal manera que el receptor inmunitario exógeno difiera de los receptores de células T alfa beta endógenos correspondientes, o de los receptores de células T gamma delta endógenos, de tal manera que un anticuerpo específico para el receptor inmunitario exógeno eliminará específicamente las células T modificadas por ingeniería genética. Estos aspectos de la divulgación se representan en la Figura 1 para el método

de enriquecimiento y en la Figura 2 para el método de agotamiento. Por lo tanto, a diferencia de cualquiera de los métodos de la técnica anterior, no es necesario incluir ningún gen adicional en la célula T modificada por ingeniería genética distinto de los genes que codifican el receptor inmunitario exógeno para permitir el agotamiento de las células T modificadas por ingeniería genética.

Por tanto, en contraste con cualquiera de los métodos de selección usados en la técnica anterior que usan, por ejemplo, marcadores de selección, o cualquiera de los métodos de destrucción selectiva usados en la técnica anterior que usan, por ejemplo, genes suicidas, la divulgación actual proporciona ahora receptores inmunitarios exógenos que no requieren ningún gen marcador de selección adicional y/o ningún gen suicida adicional. La divulgación ahora permite la producción de células T modificadas por ingeniería genética que pueden enriquecerse de manera intacta, es decir, las células T modificadas por ingeniería genética no requieren ninguna unión o interacción con ningún agente externo tal como, por ejemplo, un anticuerpo. Además, las células T modificadas por ingeniería genética con un receptor inmunitario exógeno que puede diferenciarse del receptor de células T endógeno pueden eliminarse, es decir, agotarse, con un anticuerpo selectivo dirigido específicamente al receptor inmunitario exógeno. La misma modificación que se usó en el proceso de enriquecimiento puede usarse en el proceso de agotamiento. Un primer anticuerpo se une selectivamente al receptor endógeno de células T alfa beta, mientras que no se une a una secuencia modificada del receptor de células T alfa beta modificado por ingeniería genética en el método de enriquecimiento. Por el contrario, el segundo anticuerpo ahora se une a dicha secuencia modificada del receptor de células T alfa beta modificado por ingeniería genética pero no al receptor de células T alfa beta endógeno. De esta forma, un receptor de células T alfa beta mínimamente modificado puede proporcionarse como un receptor inmunitario exógeno que permita tanto el enriquecimiento como el agotamiento *in vivo* en combinación con dos anticuerpos selectivos diferentes. Todo lo que se requiere son receptores inmunitarios exógenos y anticuerpos selectivos que sean específicos para un receptor de células T alfa beta endógeno y/o anticuerpos que sean específicos para el receptor inmunitario exógeno.

Por lo tanto, la presente divulgación ahora proporciona receptores inmunitarios exógenos que, combinados con anticuerpos selectivos, no requieren ningún gen exógeno adicional para el enriquecimiento y/o el agotamiento de las células T modificadas por ingeniería genética.

Figuras

Figura 1. Esquema que muestra el principio subyacente de enriquecimiento para células T modificadas por ingeniería genética. A) se proporciona un anticuerpo que se une al receptor endógeno de células T alfa beta (indicado con la flecha). En este escenario el anticuerpo se une a la región constante. B), C), E) y F) se proporcionan receptores inmunitarios exógenos a los que no se une el anticuerpo proporcionado (indicado con la flecha tachada). B) muestra un receptor de células T alfa beta en donde la región variable (V) es de origen endógeno y la región constante de otra especie. La secuencia de la región constante difiere de tal manera que el anticuerpo no se une a la misma. C) muestra un receptor de células T alfa beta de origen endógeno en donde parte de la cadena beta constante se reemplaza por una parte correspondiente de otra especie. E) muestra un receptor de células T gamma delta y F) muestra un receptor de antígeno quimérico. D) muestra una cadena alfa beta modificada por ingeniería genética de origen endógeno que no es adecuada como un receptor inmunitario exógeno ya que el anticuerpo que se proporciona puede unirse a la misma.

Figura 2. Esquema que muestra el principio subyacente del agotamiento *(in vivo)* de las células T modificadas por ingeniería genética. Se proporciona un anticuerpo que se une selectivamente (indicado con la flecha) al receptor exógeno de células T alfa beta que se muestra en B) y no al receptor de células T alfa beta endógeno como se representa en A) (indicado con la flecha tachada). Un anticuerpo tal también puede unirse a un receptor de células T alfa beta exógeno como se muestra en C) que corresponde sustancialmente a un receptor de células T alfa beta endógeno en donde se ha introducido un sitio de unión para el anticuerpo en la cadena beta reemplazando solo una pequeña región de la cadena beta. Las modificaciones en los receptores exógenos de células T alfa beta tales como los representados en D) que no permiten la unión del anticuerpo no son adecuadas para su uso en la estrategia de agotamiento. De forma similar, se proporciona un anticuerpo que se une selectivamente al receptor de células T gamma delta exógeno que se muestra en F) y no al receptor de células T alfa beta endógeno como se representa en E). El anticuerpo se dirige selectivamente a las células T modificadas por ingeniería genética con los receptores inmunitarios exógenos mientras que no se dirige a las células T endógenas que tienen receptores de células T endógenos como se representa en A) y F).

Figura 3. Esquema que muestra los receptores inmunitarios exógenos y los componentes del receptor de células T como se usa en la sección de ejemplos. En A) se proporciona un receptor exógeno de células T alfa beta que es de origen endógeno. Este receptor exógeno de células T alfa beta se modificó posteriormente intercambiando segmentos del mismo por segmentos de otra especie.

Toda la región constante se reemplazó como se muestra en B). O se reemplazó una parte de la región constante de la cadena beta como se muestra en C). Se utilizó una estrategia de reemplazo para reemplazar diferentes partes, diferentes dominios (D1, D2, D3, D4) de la región constante de cada cadena para identificar la secuencia a la que se une el anticuerpo que se dirige al receptor endógeno de células T alfa beta. Cada cadena modificada se emparejó con una cadena no modificada tal como se representa en C). En otra estrategia, el receptor inmunitario exógeno que se usó fue un receptor de células T gamma delta seleccionado.

Figura 4. Función antitumoral mejorada de una preparación de células T modificadas por ingeniería genética enriquecida con un receptor exógeno de células T gamma delta. Enriquecimiento de células T modificadas por

ingeniería genética con γδTCR mediante agotamiento con calidad GMP de células T positivas para αβTCR a partir de una mezcla de células T. A) Representación de citometría de flujo de pMP71: células T αβ transducidas con γ-T2A-δ antes y directamente después de la separación de células T γδTCR (TCR αβ agotado). Los linfocitos T enriquecidos se siguieron durante la expansión de linfocitos T para determinar la expresión de γδTCR. Las células T se tiñeron con un anticuerpo pan-γδTCR y pan-αβTCR y se indicaron los porcentajes de células en cada cuadrante. B) Células T transducidas con γδTCR (a granel, 9 % de γδTCR+) y células T αβ TCR agotadas (41 % de γδTCR+) se incubaron con Células Daudi cargadas con ^{51}Cr a las proporciones E:T indicadas durante 4-5 horas. Se usaron células transducidas pB:αMDM2/βp53 como células T de control. El porcentaje de lisis específica se muestra como media de triplicados +/-SD. Las significaciones estadísticas se calcularon con anova de dos vías; **p<0,01; ***p<0,001. C) Se incubaron células T transducidas con γδTCR a granel (6 % de γδTCR+) y αβTCR agotadas (51 % de γδTCR+) con diferentes células diana tumorales como se indica y se midió la secreción de IFNγ mediante IFNγ ELISPOT. Se usaron células T transducidas con pMP71:ΔNGFR como células T de control. Las manchas de IFNγ por 15000 células T se muestran como la media de triplicados +SD. Las células T solas no produjeron niveles significativos de IFNγ. Las significaciones estadísticas se calcularon con anova de dos vías; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Figura 5. Alorreactividad abolida y reactividad antitumoral conservada de una preparación de células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas con un receptor exógeno de células T gamma delta. Las PBMC derivadas de donantes sanos se transdujeron retrovíricamente con pMP71:ΔNGFR o pMP71: γ-T2A-δ, enriquecido para células T transducidas con γδTCR (αβTCR agotado y 65 % de γδTCR+) o no (a granel y 9 % de γδTCR+) y se expandieron como se describe. Las células T no se estimularon durante más de 20 días y se privaron de IL-2 durante los últimos 6 días y se consideraron células T en reposo. A) Las células T en reposo se cocultivaron con células tumorales OPM2 y un panel de EBV-LCL no coincidentes durante 24 horas. La actividad antitumoral y la alorreactividad se midieron mediante IFNγ ELISPOT. Las manchas de IFNγ por 15.000 células T se muestran como la media de triplicados +SD.

Figura 6. Unión anulada del anticuerpo αβTCR-mAb BW242 a secuencias de aminoácidos murinos en el dominio constante de αβTCR. A) Enriquecimiento eficiente de PBMC transducidas con αβTCR (αMU/βMU) completamente murinos sin sentido (αMDM2/βp53) después de la selección negativa de MACS usando pan-αβTCR mAb BW242. La figura de la izquierda representa la mezcla de células T que comprende células transducidas y no transducidas, como se ilustra por la presencia de células T $a\beta TCR^+$. La derecha representa la población enriquecida de células positivas para la expresión de αβTCR de ratón. Las células no transducidas que expresan αβTCR endógenos se agotan de la población. B) Las células JurMa se transdujeron con αβTCR (αMU/βMU) completamente murinos sin sentido (αMDM2/βp53), NY-ESO-1 αβTCR completamente humanos (αhu/βhu) o αβTCR NY-ESO-1 quiméricos, incluyendo un dominio constante murino (αhuMU/βhuMU). La tinción de Vβ4 y la tinción βratón representan niveles de expresión y se indican mediante porcentajes. La tinción con αβTCR-PE representa la unión del pan-αβTCR-mAb BW242 de grado clínico y está indicada por la Intensidad media de fluorescencia (MFI). Para todas las gráficas FACS: los datos son representativos de siete experimentos individuales.

Figura 7. Alineación de cadenas alfa y beta humanas y de ratón e intercambio de dominios. A) Alineación de secuencias de aminoácidos en regiones constantes de TCRα y TCRβ humano y de ratón. Los recuadros indican los dominios que cubren todas las diferencias de aminoácidos entre humanos y ratones; TCRCα tiene tres dominios diferentes, mientras que TCRCβ tiene cuatro dominios. Los asteriscos denotan aminoácidos idénticos dentro de secuencias humanas y murinas. B) Resumen esquemático de tres genes TCRα diferentes y cuatro genes TCRβ diferentes clonados en vectores pMP71, los recuadros grises oscuros representan dominios murinizados flanqueados por secuencias de aminoácidos humanos, como se ilustra en los recuadros de color gris claro. TCRCβ comienza con EDLKN, aminoácidos numerados 1-5, hasta KDSRG, aminoácidos numerados 176-180. El Dominio 3 del TCRCβ de ratón alineado corresponde al Dominio 3 humano con mutaciones Q88H, Y101H, N106E, E108K, T110P, Q111E, D112G, R113S, A114P, I120N, V121I. Véanse también los aminoácidos 217-250 de SEQ ID NO. 5 y 6. V: Dominio variable y C: Dominio constante. V: Dominio variable y C: Dominio constante. Las figuras A y B están adaptadas de *Sommermeyer* & *Uckert, 2010, Journal of Immunology.*

Figura 8. El dominio 3 en la cadena de TCRβ humana es parte del epítopo de unión de αβTCR-mAb BW242. Las células JurMa se transdujeron respectivamente con NY-ESO-1 αβTCR (αhu/βhu) totalmente humanos, NY-ESO-1 αβTCR quiméricos (αhuMU/βhuMU) o diferentes combinaciones de las cadenas TCRβ parcialmente murinizadas con la cadena TCRα humana correspondiente o con combinaciones de las cadenas TCRα parcialmente murinizadas con la cadena TCRβ humana. La expresión de los TCR se midió mediante tinción con Vβ4 y se analizó el reconocimiento de todas las combinaciones de TCR por αβTCR-mAb BW242 según lo determinado por citometría de flujo. Los números indican los porcentajes de fracción de células positivas para Vβ4 y la Intensidad de fluorescencia media (MFI) de la población celular total.

Figura 9. Enriquecimiento eficiente de células T modificadas por ingeniería genética transducidas con TCR alfa beta humanos parcialmente murinizados. Las células JurMa que expresan αβTCR humanos (αhu/βhu), αβTCR quiméricos (αhuMU/βhuMU), αβTCR con el dominio 3 murinizado en la cadena β (αhu/βM3) o αβTCR con murinización combinada de los dominios αM2 y βM3 (αM2/βM3) se probaron para el enriquecimiento mediante selección negativa MACS usando perlas recubiertas de αβTCR (panel derecho). Dado que todas las variantes de la cadena TCR son específicas de NY-ESO-1/HLA-A2, se mezclaron, antes de clasificar, en una proporción de 1:1 con células JurMa que expresan αβTCR específicos de WT1 completamente humanos, simulando una población heterogénea de células (panel izquierdo y panel central). Después del agotamiento, la fracción de células negativas se recogió y se midió por citometría de flujo. Las fracciones positivas para Vβ4 representan los TCR específicos de NY-ESO-1 y las fracciones Vβ21 son representativas de los TCR específicos de WT1. Los números indican los

porcentajes de células positivas para la tinción de Vβ4 o Vβ21.
Figura 10. Alineación de ejemplos de secuencias C-DOMAIN, de TR C-DOMAIN de TRA humana y de ratón, TRB, TRG y TRD C-DOMAIN. Las secuencias y las SEQ ID NO. correspondientes se enumeran en la tabla 1.

Definiciones

En la siguiente descripción y ejemplos se usa una serie de términos. Para proporcionar una comprensión clara y coherente de las memorias descriptivas y de las reivindicaciones, incluyendo el alcance a dar a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones. A menos que se defina de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos usados tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Las divulgaciones de todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias se incorporan en el presente documento en su totalidad por referencia.

Los métodos para llevar a cabo las técnicas convencionales usadas en los métodos de la divulgación serán evidentes para el experto en la materia. La práctica de técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica, química computacional, cultivo celular, ADN recombinante, bioinformática, genómica, secuenciación y campos relacionados son bien conocidos por los expertos en la materia y se analizan, por ejemplo, en las siguientes referencias bibliográficas: Sambrook *et al.*, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987 y actualizaciones periódicas; y la serie Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego.

En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitante para hacer referencia a que se incluyen los artículos que siguen a esta palabra, pero no se excluyen los artículos que no se mencionan específicamente. Abarca los verbos "que consisten esencialmente en" así como "que consisten en".

Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un/uno", "una", y "el/la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, un método para aislar "una" molécula de ADN, como se ha usado anteriormente, incluye aislar una pluralidad de moléculas (por ejemplo, decenas, cientos, miles, decenas de miles, cientos de miles, millones o más moléculas).

Alinear y alineación: Con el término "alinear" y "alineación" se entiende la comparación de dos o más secuencias de nucleótidos basándose en la presencia de tramos cortos o largos de nucleótidos idénticos o similares. En la técnica se conocen varios métodos para la alineación de secuencias de nucleótidos, que se explicarán adicionalmente más adelante. Con el término "alinear" y "alineación" también se entiende la comparación de dos o más secuencias de aminoácidos basándose en la presencia de tramos cortos o largos de aminoácidos idénticos o similares. En la técnica se conocen varios métodos para la alineación de secuencias de aminoácidos, que se explicarán adicionalmente más adelante.

"Expresión de un gen" se refiere al proceso en donde una región de ADN, que está unida operativamente a las regiones reguladoras apropiadas, particularmente un promotor, se transcribe en un ARN, que es biológicamente activo, es decir, que es capaz de traducirse en una proteína o péptido biológicamente activo (o fragmento de péptido activo) o que es activo en sí mismo (por ejemplo, en el silenciamiento génico postranscripcional o ARNi). Una proteína activa en ciertas realizaciones se refiere a una proteína que es constitutivamente activa. La secuencia codificante está preferentemente en orientación de sentido y codifica una proteína o péptido deseado biológicamente activo o un fragmento de péptido activo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "unido/a operativamente" se refiere a un enlace de elementos polinucleotídicos en una relación funcional. Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor, o más bien una secuencia reguladora de la transcripción, está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia codificante. Unido operativamente significa que las secuencias de ADN que se unen son normalmente contiguas y, cuando sea necesario unir dos o más regiones codificantes de proteínas, contiguas y en el marco de lectura.

La expresión "construcción genética" significa una secuencia de ADN que comprende una región (región transcrita), que se transcribe en una molécula de ARN (por ejemplo, un ARNm) en una célula, unida operativamente a regiones reguladoras adecuadas (por ejemplo, un promotor). Por lo tanto, una construcción genética puede comprender varias secuencias unidas operativamente, tales como un promotor, una secuencia líder en 5' que comprende, por ejemplo, secuencias implicadas en el inicio de la traducción, una región codificante (proteína), sitios donadores y aceptores de corte y empalme, secuencias intrónicas y exónicas, y una secuencia no traducida en 3' (también conocida como secuencia no traducida en 3' o 3'UTR) que comprende, por ejemplo, sitios de la secuencia de terminación de la transcripción.

"Identidad" es una medida de la identidad de secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos. En general, las secuencias se alinean de tal manera que se obtenga la coincidencia de mayor orden. La "identidad" en sí misma tiene

un significado reconocido en la técnica y puede calcularse usando técnicas publicadas. Véanse, por ejemplo: (COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PARTE I, Griffin, A. M. y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y SEQUENCE ANALYSIS PRIMER; Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991). Si bien existen varios métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, el término "identidad" es bien conocido por los expertos en la materia (Carillo, H. y Lipton, D., SIAM J. Applied Math (1988) 48:1073). Los métodos comúnmente empleados para determinar la identidad o similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, aquellos desvelados en GUIDE TO HUGE COMPUTERS, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994 y Carillo, H. y Lipton, D., SIAM J. Applied Math (1988) 48:1073. Los métodos para determinar la identidad y la similitud están codificados en programas de ordenador. Los ejemplos de métodos de programas de ordenador preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, paquete de programas GCS (Devereux, J., etal., Nucleic Acids Research (1984) 12(1):387), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F. *et al.*, J. Molec. Biol. (1990) 215:403).

Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de uno o más genes, ubicado aguas arriba con respecto a la dirección de transcripción del sitio de inicio de la transcripción del gen, y se identifica estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para la ARN polimerasa dependiente de ADN, sitios de iniciación de la transcripción y cualquier otra secuencia de ADN, incluyendo, pero no limitado a los sitios de unión del factor de transcripción, sitios de unión de proteínas represoras y activadoras y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocida por un experto en la materia para actuar directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción del promotor. Opcionalmente el término "promotor" incluye aquí también la región UTR 5' (Región no traducida 5') (por ejemplo, el promotor puede incluir aquí una o más partes en dirección 5' (5') del codón de iniciación de la traducción de un gen, ya que esta región puede tener un papel en la regulación de la transcripción y/o traducción).

Las expresiones "secuencia de aminoácidos" o "proteína" o "péptido" se refieren a moléculas que consisten en una cadena de aminoácidos, sin referencia a un modo de acción específico, tamaño, estructura tridimensional u origen. Un "fragmento" o "porción" del mismo puede, por lo tanto, seguir denominándose como una "secuencia de aminoácidos" o "proteína" o "péptido".

"Células modificadas por ingeniería genética" se refiere en el presente documento a células que han sido modificadas por ingeniería genética, por ejemplo, por la introducción de una secuencia de ácido nucleico exógena o alteración específica de una secuencia de gen endógeno. Una secuencia de ácido nucleico exógena que se introduce puede comprender una secuencia de tipo silvestre de cualquier especie que pueda modificarse. Una célula modificada puede comprender modificaciones genéticas tales como una o más mutaciones, inserciones y/o deleciones en un gen endógeno y/o inserción de un ácido nucleico exógeno (por ejemplo, una construcción genética) en el genoma. Una célula modificada puede referirse a una célula aislada o en cultivo. Las células modificadas por ingeniería genética pueden ser "células transducidas" en donde las células se han infectado con, por ejemplo, un virus modificado por ingeniería genética. Por ejemplo, puede usarse un vector retrovírico, tales como los que se describen en los ejemplos, pero también pueden contemplarse otros vectores víricos adecuados tales como los lentivirus. También pueden usarse métodos no víricos, tales como transfecciones o electroporación de vectores de ADN. Los vectores de ADN que pueden usarse son vectores de transposones. Por lo tanto, las células modificadas por ingeniería genética también pueden ser "células transfectadas de forma estable" o "células transfectadas de forma transitoria". La transfección se refiere a métodos no víricos para transferir ADN (o ARN) a células de tal manera que se exprese un gen. Los métodos de transfección son ampliamente conocidos en la técnica, tales como la transfección de fosfato de calcio, transfección de PEG y transfección liposómica o lipoplex de ácidos nucleicos. Una transfección tal puede ser transitoria, pero también puede ser una transfección estable en donde pueden seleccionarse células que tienen la construcción génica integrada en su genoma.

La expresión "marcador seleccionable" es un término familiar para los expertos en la materia y se usa en el presente documento para describir cualquier entidad genética que, cuando se expresa, puede usarse para seleccionar una célula o células que contengan el marcador seleccionable. Los productos de genes marcadores seleccionables confieren, por ejemplo, resistencia a los antibióticos u otro rasgo seleccionable o un requisito nutricional. Los marcadores seleccionables, tales como los bien conocidos en la técnica, incluyen proteína fluorescente verde (GFP), eGFP, luciferasa, GUS y similares.

Las "células αβT" o "células alfa beta T" pueden definirse con respecto a la función como linfocitos T que expresan un αβTCR, que reconoce péptidos unidos a moléculas MHC (complejo principal de histocompatibilidad), que se expresan en la superficie de diversas células. Los MHC presentan péptidos derivados de las proteínas de una célula. Cuando, por ejemplo, una célula está infectada con un virus, el MHC presentará péptidos víricos y la interacción entre el αβTCR y el complejo MHC activa tipos específicos de células T que inician respuestas inmunitarias para eliminar la célula infectada. Por tanto, las células αβT pueden definirse funcionalmente como células capaces de reconocer péptidos unidos a moléculas MHC. Las células T αβ pueden identificarse usando un anticuerpo específico para el receptor de células T αβ como se describe a continuación (por ejemplo, el anticuerpo BW242 que es específico para un TCR αβ

humano). Las células αβT pueden seleccionarse de sangre periférica, por ejemplo, a través del antígeno CD3, ya que la gran mayoría de las células T tienen el αβTCR. Tal selección también incluirá células γδT. A partir de tales células seleccionadas, puede determinarse la secuencia de ácido nucleico (o aminoácido) correspondiente a la cadena del receptor de células αT y la cadena del receptor de células βT. Por tanto, las células αβT también pueden definirse como células que comprenden una secuencia de ácido nucleico (o aminoácido) correspondiente a la cadena receptora de células αT y/o la cadena receptora de células βT.

Las "células T γδ" o "células T gamma delta" representan un pequeño subconjunto de células T para las que se desconocen en gran medida las moléculas antigénicas que desencadenan su activación. Las células T gamma delta pueden considerarse un componente de la inmunidad adaptativa en el sentido de que reorganizan los genes TCR para producir diversidad de unión y desarrollarán un fenotipo de memoria. Sin embargo, diversos subconjuntos también pueden considerarse parte de la inmunidad innata en la que se usa un TCR restringido como receptor de reconocimiento de patrones. Por ejemplo, las células T Vγ9/Vδ2 se activan específica y rápidamente por un conjunto de precursores de isoprenoides fosforilados no peptídicos, denominados colectivamente fosfoantígenos. Las células γδT pueden identificarse usando un anticuerpo específico para el receptor de células γδT. Los anticuerpos adecuados para FACS están ampliamente disponibles. Se seleccionan las condiciones, tal como lo proporciona el fabricante del anticuerpo que permite la selección de células negativas y/o positivas. Los ejemplos de anticuerpos que pueden ser adecuados están disponibles en BD Pharmingen (BD, 1 Becton Drive, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), γδTCR-APC (clon B1, #555718) o disponible de Beckman Coulter, pan-γδTCR-PE (clon IMMU510, n.ºIM1418U). También, a partir de tales células seleccionadas, puede determinarse la secuencia de ácido nucleico (o secuencia de aminoácidos) correspondiente a la cadena del receptor de células γT y la cadena del receptor de células δT. Por tanto, las células γδT también pueden definirse como células que comprenden una secuencia de ácido nucleico (o aminoácido) correspondiente a la cadena receptora de células γT y/o la cadena receptora de células δ2T.

Las células T o linfocitos T, pertenecen a un grupo de glóbulos blancos llamados linfocitos, que juegan un papel en la inmunidad mediada por células. Las células T se originan a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea, maduran en el timo (que es de donde deriva la T) y adquieren su función completa en los tejidos linfoides periféricos. Durante el desarrollo de las células T, las células T $CD4^-CD8^-$ (negativas tanto para el correceptor CD4 como para el CD8) están comprometidas con un destino αβ (alfa beta) o γδ (gamma delta) como resultado de un reordenamiento inicial del gen TCR β o δ. Las células que experimentan un reordenamiento temprano de la cadena β expresan una estructura pre-TCR compuesta por una cadena β completa y una cadena pre-TCRα en la superficie celular. Tales células cambian a un estado $CD4^+CD8^+$, reorganizan el locus de la cadena TCRα y expresar un αβTCR en la superficie. Las células T $CD4^-CD8^-$ que completan con éxito el reordenamiento del gen γ antes del reordenamiento del gen β expresan un γδTCR y siguen siendo $CD4^-CD8^-$. (Claudio Tripodo *et al.* Gamm delta T cell lymphomas Nature Reviews Clinical Oncology 6, 707-717 (diciembre de 2009). El receptor de células T se asocia a la proteína CD3 para formar un complejo receptor de células T. Las células T, es decir, que expresan un αβTCR o un γδTCR, expresan el complejo receptor de células T en la superficie celular. Las células T γδ constituyen aproximadamente el 1-5 % de la población total de células T. La región extracelular de una cadena de receptores de células T comprende una región variable. En la región variable de una cadena receptora de células T se localizan tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2, CDR3). Estas regiones son en general las más variables y contribuyen a la diversidad entre los TCR. Las regiones CDR se componen durante el desarrollo de una célula T donde los denominados segmentos Variable (V), Diverso (D) y de Unión (J) se combinan aleatoriamente para generar TCR diversos. La región constante de una cadena receptora de células T, es decir, ser una cadena alfa, beta, gamma o delta, no varía sustancialmente. De forma similar, las regiones marco de una cadena receptora de células T, es decir, ser una cadena alfa, beta, gamma o delta, tampoco varían sustancialmente.

Los linfocitos citolíticos naturales (células NK) se definen como linfocitos granulares grandes (LGL) y constituyen el tercer tipo de células diferenciadas del progenitor linfoide común que genera los linfocitos B y T. Se sabe que las células NK se diferencian y maduran en la médula ósea, el ganglio linfático, el bazo, las amígdalas y el timo, donde a continuación, entran en la circulación. Las células NK no expresan receptores de antígenos de células T (TCR) o el señalizador Pan T CD3 o receptores de células B de inmunoglobulinas (Ig) de superficie, pero suelen expresar los marcadores de superficie CD16 (FcγRIII) y CD56 en seres humanos, NK1.1 o NK1.2 en ratones C57BL/6. Hasta el 80 % de las células NK humanas también expresan CD8.

El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento y como se conoce en la técnica se refiere a cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno con regiones determinantes de complementariedad (CDR). El término incluye, pero no se limita a anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos solo de cadena pesada, anticuerpos de llama, anticuerpos y nanocuerpos de un solo dominio (por ejemplo, VHH). El término "anticuerpo" también puede incluir fragmentos de inmunoglobulina tales como Fab, F(ab')2, Fv, scFv, Fd, dAb y otros fragmentos de anticuerpo u otras construcciones que comprenden CDR que retienen la función de unión al antígeno. Normalmente, dichos fragmentos comprenden un dominio de unión a antígeno. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden comprender cualquiera de los isotipos de anticuerpos conocidos y sus conformaciones, por ejemplo, las clases IgA, tales como IgA1 o IgA2, IgD, IgE, IgG, tales como IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4 o IgM.

Descripción detallada de la divulgación

Enriquecimiento de células T modificadas por ingeniería genética

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para obtener una preparación enriquecida en células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos, que comprende las etapas de:

a) proporcionar una mezcla de células T que comprende

- células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos que comprenden una región constante murinizada, en donde se suprime la expresión de receptores endógenos de células T alfa beta; y
- células T no modificadas por ingeniería genética con receptores de células T alfa beta endógenos, en donde la etapa a) comprende la etapa de:

    i. proporcionar células T;
    ii. proporcionar un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican un receptor inmunitario exógeno;
    iii. introducir el ácido nucleico o los ácidos nucleicos en las células T para proporcionar de esta manera una mezcla de células T que comprende células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos y células T no modificadas por ingeniería genética con receptores de células T alfa beta endógenos;

b) poner en contacto la mezcla de células T con un anticuerpo que se une específicamente al receptor endógeno de células T alfa beta, para permitir la formación de un complejo de células T de anticuerpos no modificados por ingeniería;
c) retirar el complejo anticuerpo-células T no modificadas por ingeniería genética de la mezcla de células T para obtener de esta manera una preparación enriquecida en células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos.

Las células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos de acuerdo con la divulgación son células T que se han modificado por ingeniería genética de manera que expresen un receptor inmunitario exógeno. El receptor inmunitario exógeno tiene la misma función que un receptor de células T endógeno con respecto al reconocimiento del antígeno y la acción de las células T. Las células T no modificadas por ingeniería genética son células que expresan un receptor de células T endógeno. Los receptores de células T endógenos son del tipo de receptor de células T γδ o del tipo de receptor de células T αβ.

Un receptor inmunitario exógeno de acuerdo con la divulgación se define como que no es un receptor de células T endógeno. Por ejemplo, un receptor inmunitario exógeno puede ser un receptor de células T γδ seleccionado particular que es útil en el tratamiento de un cáncer. Dicha secuencia puede ser similar a un receptor de células T γδ endógeno. La diferencia es que el receptor inmunitario exógeno se ha seleccionado intencionalmente para una diana específica. El receptor inmunitario exógeno, por ejemplo, se expresa a partir de una construcción transgénica y no a partir de loci endógenos. Un receptor inmunitario exógeno de acuerdo con la divulgación puede ser de un origen diferente, es decir, de otra especie, en comparación con el origen de las células T que fueron modificadas por ingeniería genética para proporcionar células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos. Un receptor inmunitario exógeno puede ser del mismo origen, es decir, de la misma especie, en comparación con el origen de las células T que fueron modificadas por ingeniería genética para proporcionar células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos. Un receptor inmunitario exógeno también puede ser un receptor de células T γδ modificado por ingeniería genética o un receptor de células T αβ modificado por ingeniería genética.

Un receptor de células T modificado por ingeniería genética es un receptor de células T cuya secuencia de aminoácidos se ha modificado de tal manera que tiene una secuencia de aminoácidos diferente en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de un receptor de células T endógeno, es decir, al menos sin tener en cuenta las CDR de los mismos. Por tanto, la modificación tal como está presente en los receptores de células T modificados por ingeniería genética no debería interferir con la especificidad del antígeno original. En la sección de ejemplos, esto se demuestra mediante niveles de tinción comparables entre receptores de células T modificados por ingeniería genética y no modificados por ingeniería genética por multímeros de MHC marcados con fluorescencia cargados con el antígeno peptídico para el que es específico el receptor de células T original. Dicha modificación por ingeniería genética implica la modificación de la secuencia de aminoácidos de, por ejemplo, la región constante de una o ambas cadenas de receptores de células T.

Un receptor inmunitario exógeno también puede ser un receptor de antígeno quimérico (CAR). Los receptores de antígenos quiméricos (CAR) son receptores recombinantes que combinan la especificidad de un anticuerpo específico de antígeno con las funciones de activación de las células T (como revisó recientemente Shi *et al.*, Mol Cancer. 21 de septiembre de 2014;13:219). Un CAR puede ser una molécula de fusión entre un anticuerpo y un dominio transmembrana que permite la expresión de un anticuerpo en la superficie celular de una célula inmunitaria, así como la señalización en la célula.

En un aspecto de la divulgación, un receptor inmunitario exógeno se selecciona del grupo que consiste en un receptor de células T γδ modificado por ingeniería genética, un receptor de células T αβ modificado por ingeniería genética, un receptor de células T γδ o un receptor de antígeno quimérico (CAR). En un aspecto de la divulgación, un receptor inmunitario exógeno se selecciona del grupo que consiste en un receptor de células T γδ modificado por ingeniería genética, un receptor de células T αβ modificado por ingeniería genética o un receptor de células T γδ. En otro aspecto, un receptor inmunitario exógeno se selecciona del grupo que consiste en un receptor de células T αβ o γδ modificado por ingeniería genética.

En la primera etapa del método, se proporciona una mezcla de células T que comprende células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos y células T que expresan un receptor de células T αβ endógeno. Una mezcla tal de células T puede prepararse como se describe más adelante. Esta mezcla de células T se pone en contacto con un anticuerpo que se une específicamente al receptor endógeno de células T alfa beta, para permitir la formación de un complejo de células T de anticuerpos no modificados por ingeniería genética. Dicho anticuerpo que se une específicamente al receptor de células T alfa beta endógeno no se une específicamente al receptor inmunitario exógeno. Por tanto, dicho anticuerpo es selectivo para el receptor endógeno de células T alfa beta.

Un anticuerpo que se une específicamente a un receptor de células T alfa beta se une, por ejemplo, a la cadena alfa del receptor de células T, la cadena beta del receptor de células T o tanto la cadena alfa como la beta del receptor de células T. Los ejemplos de los dominios extracelulares de las cadenas alfa y beta de origen humano se enumeran respectivamente en SEQ ID NO. 1-2. Como se ha dicho, los receptores de células T alfa beta tienen dominios variables, con las regiones más variables constituidas por las CDR de las cadenas alfa y beta. Como dichos receptores endógenos de células T alfa beta de las células T no modificadas por ingeniería genética son heterogéneos con respecto a la especificidad, el anticuerpo que se une específicamente al receptor endógeno de células T alfa beta se une a poblaciones heterogéneas de receptores de células T alfa beta. Por tanto, el anticuerpo se une específicamente a regiones del receptor de células T alfa beta que se encuentran en poblaciones heterogéneas de receptores de células T alfa beta. Preferentemente, el anticuerpo se une específicamente a las regiones constantes del receptor de células T alfa beta. Preferentemente el anticuerpo se une específicamente a la región constante de la cadena alfa humana y/o a la región constante de la cadena beta humana. Preferentemente, el anticuerpo se une preferentemente a la región constante de la cadena alfa humana como se enumera para SEQ ID NO.1 y como se representa en la figura 7A y/o a la región constante de la cadena beta humana, como se enumera para SEQ ID NO.2 y como se representa en la figura 7A.

La unión de un anticuerpo que se une específicamente al receptor de células T alfa beta puede detectarse, por ejemplo, mediante análisis FACS. Por ejemplo, las células T no modificadas por ingeniería genética se ponen en contacto con un anticuerpo control o con un anticuerpo que se une específicamente al receptor de células T alfa beta. Un anticuerpo que se une específicamente al receptor de células T alfa beta de acuerdo con la divulgación puede definirse como un anticuerpo que da como resultado un aumento de la intensidad de fluorescencia media (MFI), en relación con el anticuerpo control, como se determina por citometría de flujo. La MFI es la media de la intensidad de fluorescencia en el canal de fluorescencia elegido (FITC, PE, PerCP, etc.). Como un anticuerpo de control negativo, puede usarse un anticuerpo que no se une a las inmunoglobulinas (o a una inmunoglobulina muy diferente). Por tanto, el experto es muy capaz de seleccionar las condiciones apropiadas para determinar la unión específica de un anticuerpo al receptor de células T alfa beta. La unión de anticuerpos puede expresarse en términos de especificidad y afinidad. La especificidad determina qué antígeno o epítopo del mismo se une al anticuerpo. La afinidad es una medida de la fuerza de la unión entre un anticuerpo y el antígeno (K_a).

Por lo tanto, el experto en la materia es capaz de seleccionar un anticuerpo que se una específicamente al receptor endógeno de células T alfa beta. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente al receptor de células T alfa beta endógeno humano está disponible en el mercado de Miltenyi (Miltenyi Biotec GmbH, Friedrich-Ebert-Straße 68, 51429 Bergisch Gladbach, Alemania). Este anticuerpo es del clon celular BW242/412 que es del isotipo de ratón IgG2b. Un anticuerpo BW242/412 marcado con FITC está disponible de Miltenyi con el n.º de pedido 130-098-688. El clon celular BW242/412 y el anticuerpo expresado por BW242/412 se describen en detalle i.a. el documento EP0403156B1, que se incorpora por referencia en el presente documento. En particular, tal anticuerpo es un anticuerpo codificado por la secuencia de cadena pesada y ligera de BMA031 como se enumera para el clon BMA031 en el documento EP0403156B1. Otros anticuerpos adecuados son por ejemplo, anticuerpos anti-αβTCR disponibles de Beckman Coulter, Marseille Cedex, Francia, por ejemplo pan-αβTCR-PE (n.º A39499) o pan-αβTCR-PC5 (n.º A39500). Más adecuado para cadenas alfa beta de ratón puede ser el TCRβ-PE murino (clon H57-597) disponible de BD Pharmingen (BD, 1 Becton Drive, Franklin Lakes, NJ EE.UU.)

Después de la formación del complejo de células T de anticuerpos no modificados por ingeniería genética, a continuación, el complejo de anticuerpos y células T no modificadas por ingeniería genética se separa de la mezcla de células T para obtener así una preparación enriquecida en células T modificadas por ingeniería genética. De esta forma, las células T no modificadas por ingeniería genética con receptores endógenos de células T alfa beta se eliminan de la mezcla de células T. Las etapas de separación adecuadas que usan anticuerpos específicos son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la clasificación celular activada magnética (MACS), la clasificación de células

activadas por fluorescencia (FACS) o la cromatografía de inmunoafinidad son métodos que pueden usarse. El anticuerpo que se une específicamente al receptor de células T alfa beta puede acoplarse a perlas magnéticas para MACS, o marcado fluorescentemente para FACS, o acoplarse a una resina de cromatografía adecuada. Con MACS o cromatografía de inmunoafinidad, las células que no se unen a la resina se obtienen obteniendo así un preparado enriquecido en células T modificadas por ingeniería genética. En FACS, se obtienen las células que no están marcadas, obteniendo de esta manera una preparación enriquecida en células T modificadas por ingeniería genética. Como alternativa al uso exclusivo del anticuerpo que se une específicamente al receptor de células T alfa beta, en su lugar, pueden usarse anticuerpos secundarios que son específicos para dicho anticuerpo. Por ejemplo, cuando dicho anticuerpo es un anticuerpo de ratón, puede usarse un anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado a una resina o perla magnética. El complejo de células T de anticuerpo no modificado por ingeniería genética se unirá a la resina o a la perla magnética a través del anticuerpo de cabra anti-ratón. O bien, el anticuerpo que se une específicamente al receptor de células T alfa beta puede llevar un marcador de biotina tal como se describe en los ejemplos y puede usarse un anticuerpo anti-biotina acoplado a una resina o perla magnética. Por tanto, muchos métodos de separación están disponibles y son bien conocidos por el experto en la materia que pueden ser adecuados para separar el complejo de células T de anticuerpos no modificados por ingeniería genética de la mezcla de células T para obtener de esta manera una preparación enriquecida en células T modificadas por ingeniería genética.

Como se ha dicho, la mezcla de células T también puede comprender células T modificadas por ingeniería genética que tienen una expresión subóptima del receptor inmunitario exógeno y que aún pueden tener una cantidad sustancial de receptor de células T alfa beta endógeno expresado. Por tanto, la mezcla de células T que se proporciona puede comprender células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos, células T no modificadas por ingeniería genética con receptores de células T alfa beta endógenos y células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos y receptores de células T alfa beta endógenos. Por lo tanto, en la etapa de separación, las células T no modificadas por ingeniería genética con receptores de células T alfa beta endógenos y las células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos y receptores de células T alfa beta endógenos pueden separarse también de la mezcla. Por tanto, la etapa de separación no se limita a separar únicamente las células T alfa beta endógenas de la mezcla. Por lo tanto, cuando en la etapa a) del método, se proporciona una mezcla de células T, esta mezcla también puede comprender dichas células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos y receptores de células T alfa beta endógenos. En la etapa b) puede formarse un complejo de células T modificadas por ingeniería genética con anticuerpos a través del receptor endógeno de células T alfa beta para permitir la separación de estas células en la etapa c), además de las células T no modificadas por ingeniería genética. Por ejemplo, como se muestra en el diagrama de la izquierda de la figura 4A, una mezcla de células T comprende células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos (γδTCR, cuadrante inferior derecho), células T no modificadas por ingeniería genética con receptores de células T alfa beta endógenos (αβTCR, cuadrante superior izquierdo) y células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos y receptores de células T alfa beta endógenos (tanto γδTCR como αβTCR, cuadrante superior derecho). Tras el agotamiento, se eliminan las células positivas para αβTCR, incluyendo una gran porción de células marcadas tanto para γδTCR como para αβTCR. Por lo general, dichas células también habrían permanecido en cualquier método de selección de posición convencional que esté actualmente disponible.

Como se ha dicho, en el método de la divulgación se proporciona una mezcla de células T que comprende células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos y células T no modificadas por ingeniería genética con receptores de células T alfa beta endógenos. En una realización de la divulgación, proporcionar dicha mezcla comprende las etapas de

i. proporcionar células T;
ii. proporcionar un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican un receptor inmunitario exógeno;
iii. introducir el ácido nucleico o los ácidos nucleicos en las células T para proporcionar de esta manera una mezcla de células T que comprende células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos y células T no modificadas por ingeniería genética con receptores de células T alfa beta endógenos.

La etapa de proporcionar células T puede comprender proporcionar células T alfa beta, por ejemplo, a través de la selección de celdas usando la selección MACS usando, por ejemplo, un anticuerpo receptor de células T alfa beta tal como BW242. La etapa de proporcionar células T también puede comprender proporcionar PBMC que comprenden células T que incluyen células T gamma y delta y células T alfa beta. La etapa de proporcionar células T también puede comprender proporcionar una mezcla de células que comprende células T alfa beta y células T gamma delta, por ejemplo, linfocitos T mediante selección MACS con un anticuerpo CD3. Las células T pueden ser células primarias, por ejemplo, de un sujeto, tal como un sujeto humano. Cualquier tipo de célula, que sea una célula primaria o cualquier otra línea celular será suficiente, siempre que la población celular, o una parte sustancial de la misma, comprenda células que expresan un receptor de células T alfa beta, es decir, sea positiva para el receptor de células αβT en, por ejemplo, una clasificación FACS.

Un receptor inmunitario exógeno puede ser, por ejemplo, un receptor de células T gamma delta que comprende una primera cadena que es gamma y una segunda cadena que es la cadena delta. Estos pueden proporcionarse en un solo ácido nucleico o en dos ácidos nucleicos separados. Un primer ácido nucleico que codifica la primera cadena y un segundo ácido nucleico que codifica la segunda cadena, o un único ácido nucleico que codifica tanto la primera

como la segunda cadena. Dicho ácido nucleico o ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. Siempre que se introduzca en una célula y se exprese de manera que la secuencia de aminoácidos del receptor inmunitario exógeno que codifica se exprese en la superficie de la célula.

Preferentemente en una realización, el ácido nucleico que codifica el receptor inmunitario exógeno codifica un receptor inmunitario exógeno tal como se describe en la sección de ejemplos en la que las diferentes cadenas, es decir, cadena alfa y beta o cadena gamma y delta, se expresan como un único producto de proteína traducida que comprende la secuencia enlazadora peptídica F2A o T2A, tal como se describe en los ejemplos entre las secuencias codificantes de ambas cadenas, lo que da como resultado la autoescisión de la proteína traducida de tal manera que se forman cadenas separadas.

El ácido nucleico o los ácidos nucleicos que codifican el receptor inmunitario exógeno pueden ser ARNm que puede traducirse directamente en el receptor inmunitario exógeno cuando se introduce en el citoplasma de una célula T, por ejemplo, mediante transfección. Preferentemente, el ácido nucleico (o los ácidos nucleicos) que codifica, por ejemplo, una cadena de receptor de células T está comprendido en una construcción genética. La construcción genética (o las construcciones) permite la expresión de ARNm que codifica el receptor inmunitario exógeno de tal manera que se expresa en la superficie de la célula T modificada por ingeniería genética. Una construcción genética puede estar comprendida en un vector de ADN o en un vector vírico. La introducción del ácido nucleico o ácidos nucleicos puede realizarse mediante métodos de transfección o transducción dependiendo del tipo de ácido nucleico o ácidos nucleicos que se usen. Se entiende que dependiendo de qué tipo de construcción o construcciones genéticas se usen, la construcción genética puede consistir en ADN o ARN. Por ejemplo, cuando se incorpora una construcción genética en un vector retrovírico o lentivírico, la construcción genética está comprendida en un genoma de vector de ARN (es decir, la secuencia que codifica la construcción genética). Los vectores retrovíricos y lentivíricos son bien conocidos en la técnica que tienen un genoma de ARN que, cuando entra en una célula, se transcribe inversamente en ADN que posteriormente se integra en el genoma del hospedador. La transcripción inversa, por lo tanto, da como resultado la información genética, es decir, la construcción genética, transformándose de ARN en ADN bicatenario, permitiendo de esta manera la expresión a partir del mismo. La integración es ventajosa ya que permite la proliferación de células transducidas mientras se mantiene el genoma del vector vírico que comprende la construcción genética. Una construcción genética también puede estar comprendida en un vector de ADN, por ejemplo, ADN de plásmido. Un vector de ADN adecuado puede ser un transposón. Los sistemas de transposones adecuados (por ejemplo, basados en la clase I o la clase II) son bien conocidos en la técnica. Como se ha dicho, cuando un receptor inmunitario exógeno comprende dos cadenas, por ejemplo una cadena de receptores de células T gamma y delta, pueden proporcionarse dos construcciones genéticas separadas, por ejemplo, en uno o dos vectores retrovíricos o de ADN separados. Como alternativa, una sola construcción genética también puede expresar un solo ARNm que codifica las dos cadenas, tal como se describe en la sección de ejemplos. Un ARNm tal puede codificar las dos cadenas por separado, por ejemplo, a través de un IRES, o mediante el uso de secuencias peptídicas autoescindibles como se describe en el presente documento.

El ácido nucleico o los ácidos nucleicos que se usan proporcionan la expresión del receptor inmunitario exógeno codificado. Esto se logra, por ejemplo, a través de altos niveles de expresión del receptor inmunitario exógeno usando por ejemplo, un promotor fuerte. El uso de altos niveles de expresión da como resultado la supresión de la expresión del receptor de células T endógeno como se ejemplifica en la sección de ejemplos. La expresión de células T endógenas también puede suprimirse a través de métodos alternativos y adicionales tales como por ejemplo, ARNi a través de la expresión de ARNhc, dedos de zinc, CRISPR o TALENS.

En cualquier caso, introducir el ácido nucleico o los ácidos nucleicos en las células T puede ser eficiente pero puede proporcionar una mezcla de células T que comprende células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos y células T no modificadas por ingeniería genética con receptores de células T alfa beta endógenos. Las células T no modificadas por ingeniería genética con receptores endógenos de células T alfa beta representan células T en las que no se introdujo ácido nucleico o ácidos nucleicos. También, como se dijo, las células T modificadas por ingeniería genética también pueden comprender una subpoblación de células T modificadas por ingeniería genética que también está presente en la mezcla de células T en donde la introducción no dio como resultado una supresión (suficiente) de los receptores endógenos de células T alfa beta. Dicha subpoblación de células T que no tienen (suficiente) supresión de los receptores endógenos de células T alfa beta también pueden eliminarse eficazmente de la mezcla de células T porque el anticuerpo anti-receptor de células T alfa beta puede unirse a ella. Tal población de células T modificadas por ingeniería genética puede teñirse positivamente para el receptor inmunitario exógeno y el receptor de células T alfa beta endógeno en, por ejemplo, un análisis FACS.

Las células T modificadas por ingeniería genética que comprenden un receptor inmunitario exógeno también pueden comprender marcadores seleccionables. Un marcador seleccionable puede definirse como cualquier secuencia de ácido nucleico y/o secuencia de aminoácidos además del receptor inmunitario exógeno que permite seleccionar las células que se proporcionan con él. Por ejemplo, los marcadores seleccionables pueden ser genes de resistencia a neomicina o puromicina. La selección de células a las que se ha transferido la construcción genética y/o el vector puede realizarse mediante incubación en presencia de neomicina o puromicina. Otros marcadores seleccionables pueden ser, por ejemplo, cualquiera de las proteínas fluorescentes verde, roja y amarilla. La selección puede realizarse después usando, por ejemplo, FAC. Como se ha dicho anteriormente, las células T no modificadas por ingeniería

genética que son el resultado de una supresión insuficiente de los receptores endógenos de células T alfa beta pueden comprender la construcción genética y, por lo tanto, también un marcador seleccionable. Tales células no son deseables y eliminarlas también dará como resultado un enriquecimiento de células T modificadas por ingeniería genética. Por tanto, el método de enriquecimiento también es beneficioso para las células T modificadas por ingeniería genética de la técnica anterior que se han seleccionado con un método de selección positivo, por ejemplo, mediante la inclusión de un marcador de selección adicional y/o mediante la selección de células con un anticuerpo dirigido contra el receptor inmunitario exógeno.

Sin embargo, no es necesario tener un marcador seleccionable, ya que el método de la divulgación permite retirar células no modificadas por ingeniería genética sin usar ningún marcador seleccionable. Se entiende que de acuerdo con la divulgación, el marcador seleccionable no es el receptor inmunitario exógeno. Por lo tanto, en un aspecto de la divulgación, las células T modificadas por ingeniería genética no expresan por separado un marcador seleccionable. En consecuencia, dicho ácido nucleico o ácidos nucleicos de acuerdo con la divulgación no requieren codificar un marcador de selección expresado por separado además de codificar el receptor inmunitario exógeno. Por tanto, en una realización, dicho ácido o ácidos nucleicos, o vectores de ADN, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos, transposones o similares, que codifican el receptor inmunitario exógeno no comprenden un marcador seleccionable. Se entiende que los marcadores seleccionables deben ser funcionales en las células T modificadas por ingeniería genética.

En otro aspecto de la divulgación, la mezcla de células T que comprende células T modificadas por ingeniería genética y no modificadas por ingeniería genética son células humanas. Por tanto, esto significa que el ácido nucleico o los ácidos nucleicos que codifican un receptor inmunitario exógeno se introducen en las células T humanas para proporcionar dicha mezcla de células T. Esto significa que el anticuerpo usado en el método se une específicamente al receptor de células T alfa beta humano. En un aspecto adicional de la divulgación, el anticuerpo que se une específicamente al receptor de células T alfa beta humano es un anticuerpo BW242/412. Como se ha dicho, dicho anticuerpo está disponible en el mercado de Miltenyi (Miltenyi Biotec GmbH, Friedrich-Ebert-Straße 68, 51429 Bergisch Gladbach, Alemania) y se describe en detalle i.a. en el documento EP0403156B1, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Como es evidente a partir de lo anterior, el anticuerpo que se une específicamente al receptor de células T alfa beta endógeno no se une específicamente al receptor inmunitario exógeno. Por tanto, estos criterios de selección se aplican a cualquier anticuerpo que pueda seleccionarse para el método. Por lo tanto, el receptor inmunitario exógeno puede no corresponder a un receptor de células T alfa beta que sea endógeno a las células T utilizadas, sino proporcionado como un transgén. Esto se debe a que, de lo contrario, en las etapas b) y c) de la descripción no solo se retiran las células T no modificadas por ingeniería genética, sino que también se retiran las células T modificadas por ingeniería genética. En caso de que sea deseable utilizar un receptor de células T alfa beta como receptor inmunitario exógeno, se requiere modificar la secuencia del mismo de modo que el anticuerpo ya no se una específicamente al receptor inmunitario exógeno. Por tanto, en un aspecto de la divulgación, el receptor inmunitario exógeno es un receptor de células T alfa beta modificado por ingeniería genética.

En un aspecto de la divulgación el receptor inmunitario exógeno es un receptor de células T gamma delta o un receptor de células T gamma delta modificado por ingeniería genética o un receptor de células T alfa beta modificado por ingeniería genética. En un aspecto de la divulgación el receptor inmunitario exógeno es un receptor de células T gamma delta o un receptor de células T gamma delta modificado por ingeniería genética o un receptor de células T alfa beta modificado por ingeniería genética, en donde el receptor inmunitario exógeno es del mismo origen que la mezcla de células T. En otro aspecto, el receptor inmunitario exógeno es un receptor de células T gamma delta humano o un receptor de células T gamma delta modificado por ingeniería genética humano o un receptor de células T alfa beta modificado por ingeniería genética humano. En contraste con el receptor de células T alfa beta, el receptor de células T gamma delta tiene una secuencia que es diferente del receptor de células T alfa beta. Por tanto, un anticuerpo que se une específicamente al receptor de células T alfa beta endógeno normalmente no se une específicamente a ningún receptor de células T gamma delta endógeno. Por tanto, no es necesario modificar un receptor de células T gamma delta que se usa como receptor inmunitario exógeno. Sin embargo, la modificación de un receptor de células T gamma delta puede contemplarse por otras razones, por ejemplo, cuando se usan células T modificadas por ingeniería genética *in vivo* y deben diferenciarse de las células T gamma delta endógenas, como se explica más adelante.

En una realización, el receptor inmunitario exógeno es un receptor de células T gamma delta que comprende las secuencias de cadena gamma y delta enumeradas en SEQ ID NO.3 y SEQ ID NO.4. Estas secuencias corresponden a G115 y δ5. Las células T modificadas por ingeniería genética con este receptor inmunitario exógeno pueden enriquecerse usando, por ejemplo, el anticuerpo BW242.

En otro aspecto de la divulgación, el receptor de células T alfa beta modificado por ingeniería genética o el receptor de células T gamma delta modificado por ingeniería genética comprende una región constante modificada. La modificación de la región constante puede ser ventajosa ya que se puede evitar cualquier riesgo de afectar a la región variable y, por lo tanto, a la especificidad y/o afinidad por el antígeno.

En una realización, en el método de acuerdo con la divulgación, el anticuerpo que se une específicamente al receptor de células T alfa beta humano es un anticuerpo BW242/412 y el receptor inmunitario exógeno es un receptor de células T alfa beta humano modificado por ingeniería genética. Preferentemente, la modificación por ingeniería genética comprende la modificación de la región constante del receptor de células T alfa beta humano. Más preferentemente, la región constante de modificación comprende la modificación del Dominio 3 de la cadena beta del receptor de células T, en donde preferentemente la modificación comprende la murinización del Dominio 3. Como se ejemplifica en la sección de Ejemplos, el sitio de unión del anticuerpo BW242/412 se asignó al Dominio 3 de la cadena beta del receptor de células T. Por tanto, modificar solo esta región permitirá que el anticuerpo BW242/412 sea selectivo para el receptor de células T alfa beta endógeno humano sin unirse sustancialmente al receptor inmunitario exógeno, es decir, dicha cadena de receptor de células T alfa beta humana modificada. Preferentemente, la cadena del receptor de células T alfa beta comprende la secuencia de aminoácidos murina correspondiente del Dominio 3 murino en lugar del Dominio 3 humano Dominio 3 del receptor de células T beta humano como se muestra en la figura 7A (véanse los aminoácidos 88-121 de la secuencia humana alineados con la secuencia de ratón correspondiente).

En consecuencia, como se muestra en la sección de ejemplos para el anticuerpo BW242 (o anticuerpo BMA031) combinado con la modificación específica del receptor de células T alfa beta humano correspondiente, mapeando el sitio de unión del anticuerpo que se une al receptor endógeno de células T alfa beta, la modificación del receptor de células T alfa beta humano correspondiente puede minimizarse. Por ejemplo, el sitio de unión del anticuerpo BW242/412 ahora está asignado al Dominio 3, la modificación adicional selectiva de los aminoácidos del Dominio 3 identificará los aminoácidos del Dominio 3 que interactúan con el anticuerpo BW242/412. De esta forma, puede proporcionarse un receptor de células T alfa beta humano modificado por ingeniería genética mínimamente que difiere solo en unos pocos aminoácidos. Del mismo modo, puede seguirse el mismo enfoque cuando los anticuerpos distintos de BW242 van a ser selectivos entre un receptor de células T alfa beta endógeno y un receptor de células T alfa beta modificado por ingeniería genética correspondiente.

Células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas y sus usos

En otra realización, los métodos de acuerdo con la divulgación, como se describe anteriormente, proporcionan una preparación enriquecida en células T modificadas por ingeniería genética que se puede obtener mediante cualquiera de dichos métodos. Tal preparación comprenderá un mayor porcentaje de células T modificadas por ingeniería genética en comparación con una preparación no sujeta al método. Dicha preparación de células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas que pueden obtenerse mediante cualquiera de dichos métodos también puede definirse como una preparación de células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas de las que se han separado células T no modificadas por ingeniería genética y modificadas por ingeniería genética de forma deficiente con receptores endógenos de células T alfa beta usando un anticuerpo que se une específicamente al receptor endógeno de células T alfa beta. Una preparación tal también puede definirse como una preparación de células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas en donde las células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas no comprenden sustancialmente un receptor de células T alfa beta endógeno. Una preparación tal también puede definirse como una preparación de células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas en donde las células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas no comprenden sustancialmente un receptor de células T alfa beta endógeno y tampoco comprenden un marcador seleccionable. Una preparación tal también puede definirse como una preparación de células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas en donde las células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas no comprenden sustancialmente un receptor de células T alfa beta endógeno y tampoco comprenden un marcador seleccionable y no se han seleccionado con un anticuerpo que se une al receptor inmunitario exógeno.

Dichas preparaciones de células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas muestran una destrucción aumentada de células cancerosas en comparación con las preparaciones de la técnica anterior que se enriquecen usando métodos de selección positiva como se muestra en los ejemplos. Como también se muestra en la sección de ejemplos, cuando a los linfocitos T se les proporciona un receptor inmunitario exógeno que proporciona especificidad para un cáncer particular, dichos linfocitos se destruirán selectivamente cuando se proporciona a un sujeto dicha preparación enriquecida en dichos linfocitos T modificados por ingeniería genética. Tales preparaciones enriquecidas en células T modificadas por ingeniería genética según la descripción son, por lo tanto, particularmente útiles en tratamientos médicos. Los tratamientos médicos que pueden contemplarse son, por ejemplo, el tratamiento de un cáncer. Como las células T modificadas por ingeniería genética ya no requieren la expresión de un marcador de selección, puede evitarse cualquier evento adverso relacionado con la expresión de un marcador de selección. Adicionalmente, las células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas tendrán la mayoría, si no todas, de las células T que expresan receptores de células T alfa beta endógenos retirados y, por lo tanto, puede evitarse cualquier riesgo de que los receptores de células T alfa beta endógenos provoquen un direccionamiento no deseado. Las células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas tampoco sufrirán ninguna muerte celular asociada a la unión de un anticuerpo al receptor inmunitario exógeno, tal como se usa en métodos de selección y enriquecimiento de la técnica anterior que también pueden ser perjudiciales para la calidad del producto de células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas que se administran.

Agotamiento de células T modificadas por ingeniería genética (enriquecidas) in vivo

En otra realización, un anticuerpo que se une específicamente a un receptor inmunitario exógeno como se definió anteriormente, se proporciona para su uso en el tratamiento de sujetos que padecen eventos adversos cuando se tratan con una preparación enriquecida en células T modificadas por ingeniería genética con dicho receptor inmunitario exógeno que puede obtenerse mediante uno cualquiera de los métodos anteriores. Como se explica anteriormente, las células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas que se pueden obtener mediante cualquiera de los métodos de la divulgación son útiles en tratamientos médicos. Sin embargo, dicho tratamiento puede, en algunos casos, provocar efectos secundarios adversos debido a las células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas que se administraron. Los efectos secundarios pueden ser una proliferación o activación descontrolada, o una activación contra antígenos imprevistos en células sanas, por ejemplo, del sujeto. Por tanto, en un escenario tal, es deseable eliminar selectivamente (agotar) las células T modificadas por ingeniería genética que se administraron al sujeto. Esto puede lograrse mediante la administración de un anticuerpo que se dirija específicamente a las células T modificadas por ingeniería genética, es decir, que comprende el receptor inmunitario exógeno. Dicho anticuerpo no se dirige a las células T endógenas, tales como células T alfa beta endógenas o células T gamma delta endógenas. De esta forma, ya no es necesario incluir en las células T modificadas por ingeniería genética además del receptor inmunitario exógeno una construcción genética adicional que codifique, por ejemplo, un gen suicida u otro gen que permita destruir selectivamente las células T modificadas por ingeniería genética.

Como dicho anticuerpo no se dirige a las células T endógenas, en caso de que se utilicen receptores de células T alfa beta modificados por ingeniería genética o receptores de células T gamma delta modificados por ingeniería genética que tengan un origen correspondiente a receptores de células T endógenos, dichos receptores inmunitarios exógenos deben modificarse, es decir, modificarse por ingeniería genética, de tal manera que el anticuerpo solo se dirige al receptor inmunitario exógeno. Por ejemplo, cuando se usa un receptor inmunitario exógeno que tiene la región del Dominio 3 humano reemplazada por la región del Dominio 3 del ratón, dicho anticuerpo, por ejemplo, derivado de H57-597 derivado de HB-218 (ATCC) se dirige a la región del Dominio 3 del ratón. De esta forma, en un sujeto humano, el anticuerpo se dirigirá selectivamente al receptor inmunitario exógeno diseñado y no se dirigirá al receptor de células T endógeno. Por tanto, mapear los sitios de unión de, por ejemplo, los anticuerpos que se unen a los receptores de células T alfa beta de ratón o a los receptores de células T gamma delta de ratón son útiles ya que proporcionarán regiones específicas (o incluso anticuerpos específicos) de los respectivos receptores de células T que pueden transferirse a un receptor de células T humano correspondiente. De manera óptima, como se ejemplifica con los anticuerpos mencionados BW242/412 (usados para el enriquecimiento) y H57-597 (usados para el agotamiento), la región modificada utilizada para el enriquecimiento es idéntica en secuencia a la secuencia usada para el agotamiento tal como la región derivada de la región del Dominio 3 de ratón. Esta región puede ser particularmente interesante debido a su ubicación prominente en el receptor de células T, así como a su potencial para ser inmunogénico, Del mismo modo, cuando se usa un receptor de antígeno quimérico, que puede construirse a partir de componentes que pueden ser idénticos a las proteínas del hospedador (por ejemplo, derivados de anticuerpos del hospedador y/o derivados del CD3 del hospedador), el anticuerpo se selecciona no para dirigirse a las proteínas del hospedador correspondientes sino solo al receptor de antígeno quimérico. En un mismo enfoque que se describe para el TCR alfa beta, tales secuencias del hospedador pueden modificarse, es decir, modificarse por ingeniería genética, así como que el anticuerpo administrado no se dirija a dichas proteínas huésped. Por tanto, en caso de que se use un receptor de antígeno quimérico, puede ser un receptor de antígeno quimérico modificado por ingeniería genética en el sentido de que partes de las secuencias del hospedador pueden modificarse de tal manera que el anticuerpo que se use pueda diferenciar entre el CAR diseñado y las secuencias de proteína del hospedador correspondientes. Por tanto, alineando, por ejemplo, secuencias humanas y de ratón, y comparando receptores inmunitarios humanos y de ratón con respecto a la unión de un anticuerpo tal como se describe en los ejemplos, un receptor inmunitario humano puede murinizarse, es decir, partes del receptor inmunitario humano pueden intercambiarse por una parte correspondiente del receptor murino. La parte correspondiente puede obtenerse fácilmente alineando secuencias humanas y de ratón, tal como se muestra, por ejemplo, en la figura 10. Por lo tanto, la murinización puede implicar la sustitución de una parte de la secuencia de un receptor inmunitario por una parte correspondiente de origen murino, una parte tal puede, por ejemplo, ser un tramo de 10-50 aminoácidos, pero una parte (o partes) también puede comprender uno o más aminoácidos que forman parte de las regiones que se corresponden y que difieren entre las dos secuencias.

Preferentemente, el tratamiento de los sujetos implica el tratamiento de los seres humanos, en donde preferentemente el anticuerpo es un anticuerpo humano o por ejemplo, dominios variables derivados de anticuerpos no humanos tales como el anticuerpo H57-597, se modifican por ingeniería genética en una estructura principal de anticuerpos humanos a través de la humanización. Preferentemente, se usa un anticuerpo humano porque las secuencias no humanas pueden invocar respuestas no deseadas, por ejemplo, en el caso de un anticuerpo de ratón, puede desencadenarse una respuesta humana-anti-ratón, lo que no es deseable. Se entiende que la expresión anticuerpo humano también incluye anticuerpos humanizados.

Como se ha dicho, la administración del anticuerpo dirigido al receptor inmunitario exógeno y, por lo tanto, a las células T modificadas por ingeniería genética puede inducir la destrucción selectiva de las células T modificadas por ingeniería genética. Una destrucción selectiva tal puede inducir la muerte después de la unión del anticuerpo al receptor inmunitario exógeno. Una destrucción selectiva tal puede inducirse directa o indirectamente. Se prefieren las secuencias derivadas de humanos del esqueleto del anticuerpo en el tratamiento de humanos porque la muerte selectiva puede incluir citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o apoptosis directa. En la sección de ejemplos se describe un ejemplo de dicha

destrucción selectiva.

Con respecto a los usos médicos descritos anteriormente con respecto al uso de anticuerpos que se dirigen a las células T modificadas por ingeniería genética, dicho uso médico no está restringido a preparaciones enriquecidas en células T modificadas por ingeniería genética que pueden obtenerse mediante los métodos de la descripción descritos anteriormente. Un uso médico tal también puede aplicarse a cualquier célula T modificada por ingeniería genética, con la condición de que dicho anticuerpo que se use se una específicamente al receptor inmunitario exógeno y no a los receptores inmunitarios del hospedador o secuencias proteicas del hospedador que están comprendidas en un CAR. Dichas células T modificadas por ingeniería genética también pueden enriquecerse usando métodos de la técnica anterior que usan, por ejemplo, un marcador de selección. Adicionalmente, ya que no se requiere el método para seleccionar las células T modificadas, dicho uso también es aplicable en células NK modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos.

Por tanto, en otra realización no cubierta por la invención reivindicada, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un receptor inmunitario exógeno, para su uso en el tratamiento de sujetos que padecen eventos adversos cuando se tratan con linfocitos modificados por ingeniería genética con el receptor inmunitario exógeno. Preferentemente, dicho receptor inmunitario exógeno es un receptor inmunitario modificado por ingeniería genética.

Preferentemente, dichos sujetos son humanos. Preferentemente, dichos linfocitos modificados por ingeniería genética son linfocitos humanos modificados por ingeniería genética. Preferentemente, dichos linfocitos modificados por ingeniería genética son células NK modificadas por ingeniería genética o células T modificadas por ingeniería genética. Dicho anticuerpo lo más preferentemente es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, que preferentemente induce la muerte celular de los linfocitos modificados por ingeniería genética con el receptor inmunitario exógeno como se ha descrito anteriormente.

Ejemplos

Ejemplo 1

Enriquecimiento de células T humanas modificadas por ingeniería genética con un receptor inmunitario exógeno, es decir, un receptor de células T gamma delta

Células y líneas celulares

Las células Daudi, K562, MDA-MB231, BV173, OPM2 y Phoenix-Ampho se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo. OPM2-Luciferasa (OPM2-Luc) y RPMI8226/S-luc (RPMI-Luc) fueron proporcionados amablemente por Anton Martens, SCC9 de Niels Bovenschen (ambos del Centro Médico Universitario de Utrecht, Países Bajos) y Daudi-Luciferase (Daudi-Luc) de Genmab (Utrecht, Países Bajos). Las líneas celulares linfoblastoides transformadas por EBV (EBV-LCL) (Warren *et al.*, Tissue antigens 59, 293-303 (2002) fueron un amable regalo de Tuna Mutis (Centro Médico Universitario, Países Bajos). Las PBMC se aislaron de capas leucocitarias obtenidas del Banco de Sangre de Sanquin (Ámsterdam, Países Bajos) o del Instituto de Medicina Transfusional e Inmunohematología, Frankfurt, Alemania. Las muestras de PBMC de pacientes con AML fueron un amable regalo de Matthias Theobald (Mainz, Alemania) y del Biobanco del Centro Médico Universitario de Utrecht y se recolectaron de acuerdo con las normas de GCP y Helsinki.

Diseño del vector retrovírico γ9δ2TCR

Los genes de la cadena γ9δ2TCR altamente reactivos a los tumores, clon gamma G115 y clon delta 5, se obtuvieron a través de Combinatorial-TCR Chain Exchange, codón optimizado (Geneart Life Technologies, Regensburg, Alemania) y se clonaron en el vector retrovírico pBullet como vectores de cadena única de TCR que contenían cadena γ-IRES-neomicina o cadena δ-IRES-puromicina. El G115 y el clon delta 5 comprenden las secuencias enumeradas en SEQ ID NO.3 y 4. Además, se diseñaron cuatro casetes transgénicos diferentes que contenían ambas cadenas de TCR mediante el intercambio de dos secuencias enlazadoras peptídicas 2A diferentes, F2A y T2A, y el orden de las cadenas TCR (γ9-F2A-δ2; δ2-P2A-γ9; γ9-T2A-δ2; γ9-T2A-δ2) (Figura 1A) (Szymczak *et al.*, Nature biotechnology 22, 589-594 (2004). Estos casetes de TCR se clonaron en el vector retrovírico optimizado pMP71 (Engels *et al.* Hum Gene Ther 14, 1155-1168 (2003) para expresar ambas cadenas de TCR simultáneamente. Un TCR murino sin sentido, que consiste en la cadena alfa derivada del MDM2/HLA-A2 TCR (Stanislawski *et al.*, Nat Immunol 2, 962-970 (2001) y la cadena beta del p53/HLA-A2 TCR (Kuball *et al.*, Immunity 22, 117-129 (2005) se usó como TCR de control tanto en el sistema de vector retrovírico pBullet como en el pMP71. También se usó el receptor del factor de crecimiento nervioso truncado en pMP71 como control en experimentos de transducción retrovírica (pMP71:DNGFR). Los vectores retrovíricos se introdujeron en las células T del donante mediante transducción usando métodos convencionales. Se descubrió que tanto F2A como T2A dieron como resultado la expresión del receptor exógeno de células T γ9δ2 y fueron capaces de inducir lisis específica, así como inducir la producción de IFN-γ en por ejemplo, líneas celulares de cáncer Daudi u OPM2, usando ensayos convencionales. Se descubrió que el conector peptídico T2A producía niveles de expresión más altos, según se determinó midiendo la intensidad de fluorescencia media del TCR γ9δ2 en un análisis FACS de las células T transducidas del donante. Adicionalmente, el γ9-T2A-δ2 produjo la mayor inducción de

producción de IFN-γ. El vector γ9-T2A-δ2 se usó en otros experimentos.

Enriquecimiento de células T modificadas por ingeniería genética

Las células αβT se transdujeron con pMP71: γ-T2A-δ y se incubaron con un anticuerpo anti-αβTCR marcado con biotina (clon BW242/412, Miltenyi Biotec, Alemania) seguido de incubación con un anticuerpo anti-biotina acoplado a microesferas magnéticas (anti-biotin MicroBeads, Miltenyi Biotec). A continuación, la suspensión celular se aplicó a una columna LD y las células T positivas para αβTCR se agotaron mediante separación celular MACS de acuerdo con el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotec).

Alorreactividad abolida y actividad antitumoral conservada de células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas con el γ9δ2TCR exógeno

Después del enriquecimiento, las células T γδTCR se expandieron utilizando un protocolo de expansión de células T descrito anteriormente (Riddell y Greenberg, Journal of immunological methods 128, 189-201 (1990)). Este procedimiento resultó en un agotamiento casi completo de las células T positivas individuales para αβTCR (del 51 % al 0,4 %) y un aumento espectacular de las células T positivas individuales para γδTCR (del 20 % al 77 %) (Figura 4A). De manera importante, las células T doblemente positivas para αβTCR/γδTCR que quedaron se caracterizaron por una expresión superficial relativamente baja del αβTCR endógeno. Este fenotipo se mantuvo estable hasta el día 5 después de la estimulación, cuando las células T estaban altamente activadas y proliferativas. Sin embargo, el fenotipo cambió en el día 9 hacia una población principal de células T dobles positivas αβTCR/γδTCR (68 %) y un porcentaje reducido de células positivas individuales γδTCR (25 %) cuando las células T residen en una fase más de reposo (Figura 4A).

La funcionalidad de las células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas se probó 10 días después de la selección y expansión y se comparó con células modificadas por ingeniería genética sin agotamiento de αβTCR y un control. El agotamiento de las células T αβTCR aumentó significativamente la lisis específica de las células Daudi ($p<0,01$) (Figura 4B), así como la producción de IFN-γ en respuesta a tres líneas de células tumorales diferentes ($p<0,001$) (Figura 4C). Las células T modificadas por ingeniería genética también se probaron el día 10 frente a un panel de células leucémicas primarias de pacientes con leucemia mieloide aguda (AML). El tratamiento de células leucémicas con pamidronato para bloquear la ruta del mevalonato posterior al pirofosfato de isopentenilo dio como resultado la secreción de IFNγ por parte de las células T en respuesta a 9 de 16 muestras de AML. En 5 de las 8 muestras analizadas, las células T modificadas por ingeniería genética con γδTCR enriquecidas produjeron niveles significativamente mayores de IFNγ en comparación con las células g9d2T policlonales no modificadas por ingeniería genética y aisladas de un donante sano.

Para simular una célula T en reposo después de la transferencia *in vivo* con expresión recurrente sustancial de cadenas αβTCR endógenas, se usaron células T modificadas por ingeniería genética que carecían de estímulo durante más de 20 días y carecían de IL-2 durante 6 días. Las células T simuladas (transducidas con DNGFR), modificadas por ingeniería genética con γδTCR y agotadas αβTCR modificadas por ingeniería genética con γδTCR se analizaron frente a un panel de 13 líneas celulares EBV-LCL no coincidentes o PBMC derivadas de donantes sanos en un ensayo IFNγ ELISPOT Las células T simuladas produjeron IFNγ en respuesta a 9 de 13 líneas celulares EBV-LCL. La alorreactividad de las células T a granel modificadas por ingeniería genética con γδTCR se redujo en gran medida (reducción significativa para 8 de 9 líneas EBV-LCL) y, lo que es más importante, incluso se eliminó por completo en la población de células T empobrecidas en αβTCR modificadas por ingeniería genética con γδTCR (Figura 5A). La alorreactividad reducida de las células T modificadas por ingeniería genética con γδTCR fue más evidente cuando las diferentes poblaciones de células T se analizaron frente a un panel de 20 PBMC derivadas de donantes sanos diferentes. No se detectó alorreactividad en las poblaciones de células T transducidas con γδTCR, pero las células T simuladas produjeron IFNγ en respuesta a 9 de 10 combinaciones de donantes de PBMC.

Control tumoral in vivo mejorado mediante un producto de células T modificadas por ingeniería genética optimizadas

La potencia clínica del producto de células T modificadas por ingeniería genética con γδTCR enriquecido se evaluó y comparó con las células T modificadas por ingeniería genética con γδTCR producidas con el método de transducción retrovírica pBullet y el sistema de selección de antibióticos (Voss *et al.*, Methods in molecular medicine 109, 229-256 (2005) denominadas células T pB:γδTCR. Después de la transducción de células αβT de sangre periférica, la selección con antibióticos (pBullet) o el enriquecimiento, con perlas alfa beta TCR (pMP71) y la posterior expansión de células T se evaluaron ambas preparaciones. El porcentaje de células T positivas para γδTCR fue mayor para el producto de células T γδTCR enriquecido, pero también el número de complejos γδTCR por célula aumentó más de 2 veces en comparación con las células T pB:γδTCR medidas por MFI. Además, la lisis de tres líneas de células tumorales probadas se mejoró mediante la preparación de células T modificadas por ingeniería genética con γδTCR transducidas con el casete de vector pMP71:γ-T2A-δ en comparación con las células T pB:γδ TCR. Se probó la actividad antitumoral de estas preparaciones *in vivo* en un modelo de tumor de ratón humanizado para la transferencia adoptiva de células T modificadas por ingeniería genética con γδTCR.

Se inyectaron ratones con doble inactivación $Rag2^{-/-}\gamma_C^{-/-}$ irradiados con células tumorales Daudi positivas para

luciferasa y con γδTCR o linfocitos T modificados con TCR simulado y se evaluó el crecimiento tumoral mediante imágenes de bioluminiscencia. Ambos productos de células T modificadas por ingeniería genética con γδTCR inhibieron significativamente el crecimiento tumoral en comparación con las células T TCR simuladas, pero las células T γδTCR enriquecidas retrasaron aún más el crecimiento tumoral y aumentaron significativamente la supervivencia en comparación con las células T pB:γδTCR. Se obtuvieron resultados similares en un segundo modelo de tumor usando células Luciferasa OPM2 inyectadas en ratones con doble inactivación $Rag2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ irradiados. El crecimiento tumoral se evitó por completo en 4 de 7 ratones usando la preparación de células T modificadas por ingeniería genética con γδTCR enriquecidas. 120 días después de las primeras inyecciones de tumor y células T, los ratones libres de tumor se volvieron a exponer a una segunda inyección de células tumorales sin irradiación previa y los ratones sin tratamiento previo no irradiados se usaron como control para el crecimiento del tumor. Los ratones expuestos nuevamente permanecieron libres de tumores, mientras que en los ratones sin tratamiento previo los tumores crecieron, lo que indica que el tratamiento con células T γδTCR proporcionó protección tumoral a largo plazo *in vivo.*

Conclusión

Los resultados muestran que enriquecer las células T modificadas por ingeniería genética, es decir, células T provistas de un receptor de células T gamma delta (clon gamma G115 y clon delta 5), usando un anticuerpo que se une a los receptores de células T alfa beta (BW242) da como resultado la retirada de células no transducidas. Adicionalmente, el receptor inmunitario exógeno que se expresó dio como resultado una regulación negativa del receptor de células T alfa beta endógeno. Una preparación tal de células T modificadas por ingeniería genética enriquecidas proporciona una mejora de la eficacia antitumoral y una reducción o supresión de la alorreactividad. Adicionalmente, una preparación de células T de ingeniería enriquecida de este tipo proporciona un control tumoral altamente mejorado *in vivo.*

Ejemplo 2

Enriquecimiento de células T humanas modificadas por ingeniería genética con un receptor inmunitario exógeno, es decir, *un receptor de células T alfa beta modificado por ingeniería genética*

Enriquecimiento de células T humanas modificadas por ingeniería genética con un receptor inmunitario exógeno, es decir, un *receptor de células T alfa beta de ratón*

Se ha demostrado que la introducción de γδTCR específicos de tumores regula negativamente la expresión de αβTCR endógenos en células T modificadas por ingeniería genética (véase el ejemplo 1 anterior). En consecuencia, las células T modificadas por ingeniería genética muestran una densidad mucho más baja de αβTCR endógenos en su superficie en comparación con las células αβT no modificadas por ingeniería genética. Este es un efecto que no se limita al tipo de receptor inmunitario exógeno usado. El receptor de células T alfa beta de ratón se usó como un receptor inmunitario exógeno para modificar células T humanas. Las células T alfa beta humanas se retiraron con MACS usando un anticuerpo monoclonal αβTCR-mAb Clon BW242. En consecuencia, después del aislamiento por MACS, las células αβT humanas redirigidas para expresar αβTCR murinos muestran un nivel reducido de αβTCR endógenos en su superficie (Figura 6A, comparación antes de MACS y después de MACS). Por tanto, mediante el uso de un anticuerpo específico para los receptores de células T alfa beta humanos, pueden enriquecerse las células T modificadas por ingeniería genética con receptores de células T alfa beta de ratón.

El anticuerpo BW242 no se une a un receptor de células T alfa beta humano modificado por ingeniería genética

El anticuerpo BW242 es por lo tanto selectivo entre un receptor de células T alfa beta murino y un receptor de células T alfa beta humano. Por lo tanto, se analizó la murinización de un dominio constante de TCR alfa beta humano para la unión de anticuerpos monoclonales de αβTCR. Minimizar la murinización permite el enriquecimiento de células T "intactas" con especificidad de antígeno modificada. Cuando la murinización es mínima, el receptor de células T alfa beta exógeno es sustancialmente idéntico a un receptor de células T endógeno mientras que permite eliminar selectivamente las células T que expresan una cantidad sustancial de receptor de células T alfa beta.

Se comparó la unión del anticuerpo monoclonal BW242 de αβTCR de calidad clínica (también denominado mAb BW242 o BW242) con un αβTCR completamente humano y con variantes murinizadas mediante citometría de flujo. Las células $TCR\beta^{-/-}$JurMa se transdujeron retrovíricamente con el vector retrovírico pMP71 clínicamente aprobado que contenía un αβTCR murino sin sentido (cadena a obtenida de un TCR específico de MDM2 (Stanislawski *et al.*, Nat Immunol, 2001. 2(10): p. 962-70) y cadena β obtenida de un TCR específico de p53 (Kuball *et al.*, Immunity, 2005. 22(1): p. 117-29) o con un αβTCR completamente humano específico de NY-ESO-1/HLA-A2, o un αβTCR quimérico específico de NY-ESO-1/HLA-A2 compuesto por dominios variables humanos y constantes murinos (también denominados αMU/βMU, αhu/βhu y αhuMU/βhuMU, respectivamente). La expresión de TCR transgénico se confirmó mediante tinción con anti-Vβ4, dirigido contra la región variable de la cadena β de NY-ESO-1 TCR, o anti-βratón, dirigida contra la cadena TCRβ del TCR murino MDM2/p53. Reemplazar los dominios constantes TCRα y β humanos por equivalentes murinos anuló la unión de mAb BW242, a niveles similares a la unión a un TCR completamente murino (paneles inferiores de la Figura 6B, compárense los paneles 6 y 8). Estos datos indican que la murinización de la región constante del αβTCR humano es suficiente para anular la unión de mAb BW242.

Se dispone de cadenas β y TCRa híbridas con bloques mutacionales que cubren todas las diferencias de aminoácidos entre las regiones constantes de los αβTCR humanos y de ratón (Véase la figura 7A y B) (Sommermeyer *et al.*, J Immunol, 2010. 184(11): p. 6223-31). Los presentes inventores obtuvieron cuatro construcciones de cadena NY-ESO-1 TCRβ y tres de cadena NY-ESO-1 TCRα, conteniendo cada una un dominio murino no homólogo flanqueado por secuencias de aminoácidos humanas completas. Estos también se representan esquemáticamente en la figura 3. Las 7 construcciones de TCR diferentes se introdujeron junto con la otra cadena de TCR completamente humana en células JurMa y se expresaron y se probaron para reconocimiento por mAb BW242 (Figura 8). La eficiencia de transducción de las construcciones se midió mediante anti-Vβ4 y las transducciones se realizaron en paralelo. En cuanto al reconocimiento por el clon anti-αβTCR BW242, solo las células que expresan αβTCR que incluyen los dominios constantes murinos completos de ambas cadenas (paneles αhuMu/βhuMu) y las células que expresan αhuMu/βM3 mostraron una reducción en la unión de mAb BW242. Esto significa que la unión de anticuerpos de mAb BW242 se vio significativamente afectada en células que expresan la construcción que incluye el dominio murino 3 (βM3). Por tanto, los receptores de células T alfa beta humanos modificados por ingeniería genética que tienen el Dominio 3 de la cadena beta modificado, tal como reemplazándolo por una cadena beta Dominio 3 de una cadena beta de ratón o reemplazando toda la región constante de las cadenas alfa y beta, no se seleccionará en por ejemplo, un método de separación MACS usando BW242.

El receptor de células T alfa beta diseñado mantiene la especificidad

Las células JurMa que expresan NY-ESO-1 αβTCR humanos, los αβTCR quiméricos NY-ESO-1 o los βM3 murinizados con cadena TCRα humana se tiñeron con pentámeros específicos de NY-ESO-1 y la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la fracción celular positiva para la unión de pentámeros se midió mediante citometría de flujo. Se demostró que NY-ESO-1 αβTCR completamente humanos, NY-ESO-1 αβTCR quiméricos que tienen regiones constantes completamente de ratón y el βM3 murinizado con la cadena TCRα humana, todos se unieron con pentámeros específicos de NY-ESO-1

El anticuerpo BW242 permite enriquecer las células T modificadas por ingeniería genética con un receptor de células T alfa beta humano modificado por ingeniería genética

Se determinó si la tecnología de separación BW242 MACS podría usarse para enriquecer las células TCR modificadas por ingeniería genética con un receptor de células T alfa beta humanas modificadas por ingeniería genética. Se usaron poblaciones celulares mixtas. La población de células T que comprende células T que no expresan ningún receptor de células T alfa beta, células T que expresan un receptor de células T alfa beta de tipo silvestre y células que expresan un receptor de células T alfa beta con la especificidad deseada en las que este receptor se modifica opcionalmente para anular la unión con BW242. Por lo tanto, las células T que expresan TCR transgénicos, αβTCR específicos de NY-ESO-1/HLA-A2, se mezclaron en una proporción de 1:1 con células transgénicas αβTCR humanas específicas de WT1. Posteriormente, la purificación de estas mezclas de células se evaluó usando perlas inmunomagnéticas recubiertas con mAb αβTCR y la fracción de células no unidas se analizó mediante citometría de flujo (Figura 9). Las células modificadas con αβTCR quiméricos humano-ratón, es decir, αhuMU/βhuMU-TCR, αhu/βM3-TCR o αM2/βM3-TCR se enriquecieron eficientemente a partir de la población mixta (véanse los paneles con tinción de Vβ4, los porcentajes aumentan del 13 % al 42 %), mientras que las células que expresaban NY-ESO-1 totalmente humano o αβTCR específicos de WT1 no fueron detectables en las fracciones de flujo continuo (véanse los paneles con tinción de Vβ21, el porcentaje disminuye del 45 % a aproximadamente el 1 %). Cabe destacar que, las células no transducidas permanecieron en la población resultante, ya que el mAb BW242 tampoco afecta a las células TCR negativas. Esto muestra que la murinización de al menos el dominio 3 en TCRβ es suficiente para el enriquecimiento de αβTCR reactivos con tumores.

Lisis selectiva de células T modificadas por ingeniería genética con un αβTCR humano murinizado

Se proporcionaron células JurMa que expresaban αβTCR humanos y αβTCR quiméricos humanos murinizados (αhu/βM3). Se proporcionó un anticuerpo que se dirige específicamente a la cadena β de TCR, H57-597 (adquirido de Biolegend Inc., San Diego, CA 92121 por ejemplo, bajo el n.º de catálogo 109201. H57-597 es del isotipo Armenio Hamser IgG1. El porcentaje de lisis se evaluó usando un ensayo convencional de liberación de cromo. Las células JurMa con el αβTCR humano murinizado mostraron un aumento de cuatro veces en la lisis. Esto indica que el H57-597 destruye selectivamente las células JurMa que llevan αβTCR humano murinizado sobre αβTCR completamente humano.

Listado de secuencias

SEQ ID NO.1-4 enumera las secuencias de aminoácidos de los TCR. La región variable no está subrayada. La secuencia en cursiva en las regiones variables corresponde a la región CDR3. Las regiones constantes de las cadenas se enumeran subrayadas.

SEQ ID NO.1: Cadena de TCRα humano (clon RA14):

MEKNPLAAPLLILWTHLDCVSILNVEQSPQSLHVQEGDSTNFTCSFPSSNFYALHWYRWETA
KSPEALFVMTLNGDEKKKGRISATLNTKEGYSYLYIKGSQPEDSATYL*CARNTGNQFYF*GTG
TSLTVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSM
DFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVI
GFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO. 2: Cadena de TCRβ humano (clon RA14):

MGIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPG
MGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYF*CASSPVTGGIYG*
*YTF*GSGTRLTVVEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGK
EVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWT
QDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVK
RKDSRG

SEQ ID NO.3 Cadena de TCRγ humano (clon G115):

MVSLLHASTLAVLGALCVYGAGHLEQPQISSTKTLSKTARLECVVSGITISATSVYWYRERPG
EVIQFLVSISYDGTVRKESGIPSGKFEVDRIPETSTSTLTIHNVEKQDIATYY*CALWEAQQELG*
*KKIKVF*GPGTKLIITDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDVIKIHWEEKKS
NTILGSQEGNTMKTNDTYMKFSWLTVPEKSLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEIIFPPIKTDVIT
MDPKDNCSKDANDTLLLQLTNTSAYYMYLLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAFCCNGEKS

SEQ ID NO.4 Cadena de TCRδ humano (clon G115):

MERISSLIHLSLFWAGVMSAIELVPEHQTVPVSIGVPATLRCSMKGEAIGNYYINWYRKTQGN
TMTFIYREKDIYGPGFKDNFQGDIDIAKNLAVLKILAPSERDEGSYY*CACDTLGMGGEYTDKLI*
*F*GKGTRVTVEPRSQPHTKPSVFVMKNGTNVACLVKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPS
GKYNAVKLGKYEDSNSVTCSVQHDNKTVHSTDFEVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSCHKP
KAIVHTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL

A continuación se enumeran (partes de) las secuencias disponibles en la base de datos Genbank del NCBI con los números AAT27465, AAK49780, AAT27464, X02883, M64239, M12887, M12888, X02384(AH002088), M26057, M22148, M23381, M14996, M15002, M17323, M13340, M12834, M12837, AF021335, que se incorporan en el presente documento por referencia.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de (partes de) receptores de células T de origen humano o de ratón.

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
5	AAT27465 306 aa precursor de la cadena beta del receptor de células T *Mus musculus*	matrllcytv lcllgariln skviqtpryl vkgqgqkakm rcipekghpv vfwyqqnknn efkflinfqn qevlqqidmt ekrfsaecps nspcsleiqs seagdsalyl casslsgggt evffgkgtrl tvvedlrnvt ppkvslfeps kaeiankqka tlvclargff pdhvelswwv ngkevhsgvs tdpqaykesn ysyclssrlr vsatfwhnpr nhfrcqvqfh glseedkwpe gspkpvtqni saeawgradc gitsasyhqg vlsatilyei llgkatlyav lvsglvlmam vkkkns
6	AAK49780 306 aa precursor de la cadena beta del receptor de células T *Mus musculus*	mnkwvfcwvt lclltvetth gdggiitqtp kfligqegqk ltlkcqqnfn hdtmywyrqd sgkglrliyy sitendlqkg dlsegydasr ekkssfsltv tsaqknemav flcasgdwgy eqyfgpgtrl tvledlrnvt ppkvslfeps kaeiankqka tlvclargff pdhvelswwv ngkevhsgvs tdpqaykesn ysyclssrlr vsatfwhnpr nhfrcqvqfh glseedkwpe gspkpvtqni saeawgradc gitsasyhqg vlsatilyei llgkatlyav lvsglvlmam vkkkns
7	AAT27464 269 aa precursor de la cadena alfa del receptor de células T *Mus musculus*	mvlallpvlg ihfvlrdaqa qsvtqpdarv tvsegaslql rckysysgtp ylfwyvqypr qglqlllkyy sgdpvvqgvn gfeaefsksn ssfhlrkasv hwsdsavyfc vlsedsnyql iwgsgtklii kpdiqnpepa vyqlkdprsq dstlclftdf dsqinvpktm esgtfitdkt vldmkamdsk sngaiawsnq tsftcqdifk etnatypssd vpcdatltek sfetdmnlnf qnlsvmglri lllkvagfnl lmtlrlwss

(continuación)

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
8	AAK49779 268 aa precursor de la cadena alfa del receptor de células T *Mus musculus*	mkrllcslg llctqvcwvk gqqvqqspas lvlqegenae lqcnfsstat rlqwfyqrpg gslvsllynp sgtkhtgrlt sttvtkerrs slhisssqtt dsgtyfcats svntgnykyv fgagtrlkvi ahiqnpepav yqlkdprsqd stlclftdfd sqinvpktme sgtfitdktv ldmkamdsks ngaiawsnqt sftcqdifke tnatypssdv pcdatlteks fetdmnlnfq nlsvmglril llkvagfnll mtlrlwss
9	X02883	DIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYI TDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEK SFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
10	M64239	IQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVL DMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTC
11	M12887	DLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAV LVSALVLMAMVKRKDF
12	M12888	DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAV LVSALVLMAMVKRKDSRG
13	AH002088(X02384)	DLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEED KWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVST LVVMAMVKRKNS

(continuación)

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
14	M26057	DLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEED KWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSG LVLMAMVKKKNS
15	M22148	PSYTGGYADKLIFGKGTRVTVEPRSQPHTKPSVFVMKNGTNVAC LVKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAVKLGKYEDSNSVTCSVQHDNK TVHSTDFEVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLGLRMLF AKTVAVNFLLTAKLFFL
16	M23381	SQPPAKPSVFIMKNGTNVACLVKDFYPKEVTISLRSSKKIVEFD PAIVISPSGKYSAVKLGQYGDSNSVTCSVQHNSETVHSTDFEPYANSFNNEKLPEPEN DTQISEPCYGPRVTVHTEKVNMMSLTVLGLRLLFAKTIAINFLLTVKLFF
17	M14996	KQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDVIKIH WQEKKSNTILGSQEGNTMKTNDTYMKFSWLTVPEKSLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEI IFPPIKTDVITMDPKDNCSKDANDTLLLQLTNTSAYYMYLLLLLKSVVYFAIITCCLL RRTAFCCNGEKS
18	M15002	KQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDIIKIH WQEKKSNTILGSQEGNTMKTNDTYMKFSWLTVPEESLDKEHRCIVR HENNKNGIDQEIIFPPIKT
19	M17323	KQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDIIKIH WQEKKSNTILGSQEGNTMKTNDTYMKFSWLTVPEESLDKEHRCIVRHENNKNGIDQEI IFPPIKTDVTTVDPKDSYSKDANDVTTVDPKYNYSKDANDVITMDPKDNWSKDANDTL LLQLTNTSAYYMYLLLLLKSVVYFAIITCCLLGRTAFCCNGEKS
20	M13340	KRLDADISPKPTIFLPSVAETNLHKTGTYLCLLEKFFPDVIRVY WKEKDGNTILDSQEGDTLKTNDTYMKFSWLTVPERAMGKEHRCIVKHENNKGGADQEI FFPSIKKVAVSTKPTTCWQDKNDVLQLQFTITSAYYTYLLLLLKSVIYLAIISFSLLR RTSVCGNEKKS

(continuación)

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
21	M12834	KRLDADISPKPTIFLPSVAETNLHKTGTYLCLLEKFFPDVIRVY WKEKNGNTILDSQEGDTLKTKGTYMKFSWLTVPERAMGKEHSCIVKHENNKGGADQEI FFPSIKKVATTCWQDKNDVLQFQFTSTSAYYTYLLLLLKSVIYLAIISFSLLRRTSVC GNEKKS
22	M12837	KKLDADISPKPTIFLPSVAETNLHKTGTYLCVLEKFFPDVIRVY WKEKKGNTILDSQEGDMLKTNDTYMKFSWLTVPERSMGKEHRCIVKHENNKGGADQE IFFPTIKKVAVSTKPTTCWQDKNDVLQLQFTITSAYYTYLLLLLKSVIYLAIISFSLLR RTSVCCNEKKS
23	AF021335	KRLDADISPKPTIFLPSVAETNLHKTGTYLCLLEKFFPDVIRVY WKEKNGNTILDSQEGDTLKTKGTYMKFSWLTVPERAMGKEHSCIVKHENNKGGADQEI FFPSIKKVATTCWQDKNDVLQFQFTSTSAYYTYLLLLLKSVIYLAIISFSLLRRTSVC GNEKKS

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UMC Utrecht Holding B.V.

<120> selección de células T modificadas por ingeniería genética y agotamiento de linfocitos modificados por ingeniería genética

<130> P32146EP00

<160> 23

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 272
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```
Met Glu Lys Asn Pro Leu Ala Ala Pro Leu Leu Ile Leu Trp Thr His
1               5                  10                  15

Leu Asp Cys Val Ser Ile Leu Asn Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu
            20                  25                  30

His Val Gln Glu Gly Asp Ser Thr Asn Phe Thr Cys Ser Phe Pro Ser
        35                  40                  45

Ser Asn Phe Tyr Ala Leu His Trp Tyr Arg Trp Glu Thr Ala Lys Ser
    50                  55                  60

Pro Glu Ala Leu Phe Val Met Thr Leu Asn Gly Asp Glu Lys Lys Lys
65                  70                  75                  80

Gly Arg Ile Ser Ala Thr Leu Asn Thr Lys Glu Gly Tyr Ser Tyr Leu
                85                  90                  95

Tyr Ile Lys Gly Ser Gln Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala
            100                 105                 110

Arg Asn Thr Gly Asn Gln Phe Tyr Phe Gly Thr Gly Thr Ser Leu Thr
        115                 120                 125

Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg
    130                 135                 140

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
145                 150                 155                 160

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr
                165                 170                 175
```

```
Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser
            180                 185                 190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe
        195                 200                 205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser
    210                 215                 220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn
225                 230                 235                 240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu
                245                 250                 255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
            260                 265                 270
```

<210> 2
<211> 312
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```
Met Gly Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala
1               5                   10                  15

Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu
            20                  25                  30

Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His
        35                  40                  45

Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu
    50                  55                  60

Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro
65                  70                  75                  80

Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg
                85                  90                  95

Leu Leu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser
            100                 105                 110

Ser Pro Val Thr Gly Gly Ile Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr
        115                 120                 125
```

```
Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val
    130                 135                 140

Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala
145                 150                 155                 160

Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu
                165                 170                 175

Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp
            180                 185                 190

Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys
        195                 200                 205

Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg
    210                 215                 220

Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp
225                 230                 235                 240

Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala
                245                 250                 255

Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln
            260                 265                 270

Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys
        275                 280                 285

Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met
    290                 295                 300

Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
305                 310
```

<210> 3
<211> 315
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

```
Met Val Ser Leu Leu His Ala Ser Thr Leu Ala Val Leu Gly Ala Leu
1               5                   10                  15

Cys Val Tyr Gly Ala Gly His Leu Glu Gln Pro Gln Ile Ser Ser Thr
            20                  25                  30
```

```
Lys Thr Leu Ser Lys Thr Ala Arg Leu Glu Cys Val Val Ser Gly Ile
        35                  40                  45

Thr Ile Ser Ala Thr Ser Val Tyr Trp Tyr Arg Glu Arg Pro Gly Glu
    50                  55                  60

Val Ile Gln Phe Leu Val Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Val Arg Lys
65                  70                  75                  80

Glu Ser Gly Ile Pro Ser Gly Lys Phe Glu Val Asp Arg Ile Pro Glu
                85                  90                  95

Thr Ser Thr Ser Thr Leu Thr Ile His Asn Val Glu Lys Gln Asp Ile
            100                 105                 110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Glu Ala Gln Gln Glu Leu Gly Lys
        115                 120                 125

Lys Ile Lys Val Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Ile Ile Thr Asp Lys
    130                 135                 140

Gln Leu Asp Ala Asp Val Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu Pro Ser
145                 150                 155                 160

Ile Ala Glu Thr Lys Leu Gln Lys Ala Gly Thr Tyr Leu Cys Leu Leu
                165                 170                 175

Glu Lys Phe Phe Pro Asp Val Ile Lys Ile His Trp Glu Glu Lys Lys
            180                 185                 190

Ser Asn Thr Ile Leu Gly Ser Gln Glu Gly Asn Thr Met Lys Thr Asn
        195                 200                 205

Asp Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Lys Ser Leu
    210                 215                 220

Asp Lys Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn Asn Lys Asn Gly
225                 230                 235                 240

Val Asp Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr Asp Val Ile Thr
                245                 250                 255

Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu
            260                 265                 270

Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu
        275                 280                 285
```

Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg
290 295 300

Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
305 310 315

<210> 4
<211> 292
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Met Glu Arg Ile Ser Ser Leu Ile His Leu Ser Leu Phe Trp Ala Gly
1 5 10 15

Val Met Ser Ala Ile Glu Leu Val Pro Glu His Gln Thr Val Pro Val
20 25 30

Ser Ile Gly Val Pro Ala Thr Leu Arg Cys Ser Met Lys Gly Glu Ala
35 40 45

Ile Gly Asn Tyr Tyr Ile Asn Trp Tyr Arg Lys Thr Gln Gly Asn Thr
50 55 60

Met Thr Phe Ile Tyr Arg Glu Lys Asp Ile Tyr Gly Pro Gly Phe Lys
65 70 75 80

Asp Asn Phe Gln Gly Asp Ile Asp Ile Ala Lys Asn Leu Ala Val Leu
85 90 95

Lys Ile Leu Ala Pro Ser Glu Arg Asp Glu Gly Ser Tyr Tyr Cys Ala
100 105 110

Cys Asp Thr Leu Gly Met Gly Gly Glu Tyr Thr Asp Lys Leu Ile Phe
115 120 125

Gly Lys Gly Thr Arg Val Thr Val Glu Pro Arg Ser Gln Pro His Thr
130 135 140

Lys Pro Ser Val Phe Val Met Lys Asn Gly Thr Asn Val Ala Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Glu Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Arg Ile Asn Leu Val Ser Ser
165 170 175

Lys Lys Ile Thr Glu Phe Asp Pro Ala Ile Val Ile Ser Pro Ser Gly
180 185 190

Lys Tyr Asn Ala Val Lys Leu Gly Lys Tyr Glu Asp Ser Asn Ser Val
195 200 205

Thr Cys Ser Val Gln His Asp Asn Lys Thr Val His Ser Thr Asp Phe
210 215 220

Glu Val Lys Thr Asp Ser Thr Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu
225 230 235 240

Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val
245 250 255

His Thr Glu Lys Val Asn Met Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg
260 265 270

Met Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys
275 280 285

Leu Phe Phe Leu
290

<210> 5
<211> 306
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 5

Met Ala Thr Arg Leu Leu Cys Tyr Thr Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

Arg Ile Leu Asn Ser Lys Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys
20 25 30

Gly Gln Gly Gln Lys Ala Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His
35 40 45

Pro Val Val Phe Trp Tyr Gln Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe
50 55 60

Leu Ile Asn Phe Gln Asn Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr
65 70 75 80

Glu Lys Arg Phe Ser Ala Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu
85 90 95

Glu Ile Gln Ser Ser Glu Ala Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala
100 105 110

```
Ser Ser Leu Ser Gly Gly Gly Thr Glu Val Phe Phe Gly Lys Gly Thr
        115                 120                 125

Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val
    130                 135                 140

Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala
145                 150                 155                 160

Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu
                165                 170                 175

Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp
            180                 185                 190

Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg
        195                 200                 205

Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg
    210                 215                 220

Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu
225                 230                 235                 240

Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly
                245                 250                 255

Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr His Gln Gly Val Leu
            260                 265                 270

Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr
        275                 280                 285

Ala Val Leu Val Ser Gly Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Lys Lys
    290                 295                 300
```

Asn Ser

305

<210> 6
<211> 306
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 6

```
Met Asn Lys Trp Val Phe Cys Trp Val Thr Leu Cys Leu Leu Thr Val
1               5                   10                  15
```

```
Glu Thr Thr His Gly Asp Gly Gly Ile Ile Thr Gln Thr Pro Lys Phe
            20                  25                  30

Leu Ile Gly Gln Glu Gly Gln Lys Leu Thr Leu Lys Cys Gln Gln Asn
        35                  40                  45

Phe Asn His Asp Thr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Ser Gly Lys Gly
    50                  55                  60

Leu Arg Leu Ile Tyr Tyr Ser Ile Thr Glu Asn Asp Leu Gln Lys Gly
65                  70                  75                  80

Asp Leu Ser Glu Gly Tyr Asp Ala Ser Arg Glu Lys Lys Ser Ser Phe
                85                  90                  95

Ser Leu Thr Val Thr Ser Ala Gln Lys Asn Glu Met Ala Val Phe Leu
            100                 105                 110

Cys Ala Ser Gly Asp Trp Gly Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr
        115                 120                 125

Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val
    130                 135                 140

Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala
145                 150                 155                 160

Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu
                165                 170                 175

Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp
            180                 185                 190

Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg
        195                 200                 205

Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg
    210                 215                 220

Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu
225                 230                 235                 240

Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly
                245                 250                 255

Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr His Gln Gly Val Leu
```

260 265 270

Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr
275 280 285

Ala Val Leu Val Ser Gly Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Lys Lys
290 295 300

Asn Ser
305

<210> 7
<211> 269
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 7

Met Val Leu Ala Leu Leu Pro Val Leu Gly Ile His Phe Val Leu Arg
1 5 10 15

Asp Ala Gln Ala Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val
20 25 30

Ser Glu Gly Ala Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Gly
35 40 45

Thr Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Arg Gln Gly Leu Gln
50 55 60

Leu Leu Leu Lys Tyr Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn
65 70 75 80

Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg
85 90 95

Lys Ala Ser Val His Trp Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Val Leu
100 105 110

Ser Glu Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ser Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Ile Ile Lys Pro Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu
130 135 140

Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe
145 150 155 160

Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile

```
                    165                 170                 175

Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn
            180                 185                 190

Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile
        195                 200                 205

Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp
    210                 215                 220

Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe
225                 230                 235                 240

Gln Asn Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
                245                 250                 255

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
            260                 265
```

<210> 8
<211> 268
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 8

```
Met Lys Arg Leu Leu Cys Ser Leu Leu Gly Leu Leu Cys Thr Gln Val
1               5                  10                  15

Cys Trp Val Lys Gly Gln Gln Val Gln Gln Ser Pro Ala Ser Leu Val
            20                  25                  30

Leu Gln Glu Gly Glu Asn Ala Glu Leu Gln Cys Asn Phe Ser Ser Thr
        35                  40                  45

Ala Thr Arg Leu Gln Trp Phe Tyr Gln Arg Pro Gly Gly Ser Leu Val
    50                  55                  60

Ser Leu Leu Tyr Asn Pro Ser Gly Thr Lys His Thr Gly Arg Leu Thr
65                  70                  75                  80

Ser Thr Thr Val Thr Lys Glu Arg Arg Ser Ser Leu His Ile Ser Ser
                85                  90                  95

Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Thr Ser Ser Val
            100                 105                 110

Asn Thr Gly Asn Tyr Lys Tyr Val Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Lys
```

```
            115                 120                 125

Val Ile Ala His Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys
    130                 135                 140

Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
145                 150                 155                 160

Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr
                165                 170                 175

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly
            180                 185                 190

Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe
        195                 200                 205

Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala
    210                 215                 220

Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln
225                 230                 235                 240

Asn Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly
                245                 250                 255

Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
            260                 265
```

<210> 9
<211> 141
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

```
Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
1               5                  10                  15

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
            20                  25                  30

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr
        35                  40                  45

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
    50                  55                  60

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
65                  70                  75                  80

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp
                85                  90                  95

Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe
            100                 105                 110

Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
        115                 120                 125

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
    130                 135                 140
```

<210> 10
<211> 72
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 10

```
Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser
1               5                  10                  15

Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn
            20                  25                  30

Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val
        35                  40                  45

Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp
    50                  55                  60

Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys
65                  70
```

<210> 11

<211> 176
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

```
Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser
1               5                  10                  15

Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala
            20                  25                  30

Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly
        35                  40                  45

Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu
    50                  55                  60

Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg
65                  70                  75                  80

Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln
                85                  90                  95

Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg
            100                 105                 110

Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala
        115                 120                 125

Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala
    130                 135                 140

Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val
145                 150                 155                 160

Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Phe
                165                 170                 175
```

<210> 12
<211> 178
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

```
Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser
1               5                  10                  15

Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala
            20                  25                  30

Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly
        35                  40                  45

Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu
    50                  55                  60

Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg
65                  70                  75                  80

Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln
                85                  90                  95

Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg
            100                 105                 110

Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala
        115                 120                 125

Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala
    130                 135                 140

Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val
145                 150                 155                 160

Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser
                165                 170                 175

Arg Gly
```

<210> 13
<211> 172
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 13

```
Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro Ser
1               5                  10                  15

Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala
            20                  25                  30

Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly
        35                  40                  45

Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu
    50                  55                  60

Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr
65                  70                  75                  80

Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe His
                85                  90                  95

Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro Val
            100                 105                 110

Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Ile
        115                 120                 125

Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr
    130                 135                 140

Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Thr
145                 150                 155                 160

Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser
                165                 170
```

<210> 14
<211> 172
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 14

```
Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro Ser
1               5                  10                  15

Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala
            20                  25                  30

Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly
        35                  40                  45

Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu
    50                  55                  60

Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr
65                  70                  75                  80

Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe His
                85                  90                  95

Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro Val
            100                 105                 110

Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Ile
        115                 120                 125

Thr Ser Ala Ser Tyr His Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr
    130                 135                 140

Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Gly
145                 150                 155                 160

Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Lys Lys Asn Ser
                165                 170
```

<210> 15
<211> 177
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

```
Pro Ser Tyr Thr Gly Gly Tyr Ala Asp Lys Leu Ile Phe Gly Lys Gly
1               5                  10                  15

Thr Arg Val Thr Val Glu Pro Arg Ser Gln Pro His Thr Lys Pro Ser
            20                  25                  30

Val Phe Val Met Lys Asn Gly Thr Asn Val Ala Cys Leu Val Lys Glu
        35                  40                  45

Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Arg Ile Asn Leu Val Ser Ser Lys Lys Ile
    50                  55                  60

Thr Glu Phe Asp Pro Ala Ile Val Ile Ser Pro Ser Gly Lys Tyr Asn
65                  70                  75                  80

Ala Val Lys Leu Gly Lys Tyr Glu Asp Ser Asn Ser Val Thr Cys Ser
                85                  90                  95

Val Gln His Asp Asn Lys Thr Val His Ser Thr Asp Phe Glu Val Lys
            100                 105                 110

Thr Asp Ser Thr Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys
        115                 120                 125

Gln Pro Ser Lys Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu
    130                 135                 140

Lys Val Asn Met Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe
145                 150                 155                 160

Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe
                165                 170                 175

Leu
```

<210> 16
<211> 152
<212> **PRT**
<213> *Mus musculus*

<400> 16

Ser Gln Pro Pro Ala Lys Pro Ser Val Phe Ile Met Lys Asn Gly Thr
1 5 10 15

Asn Val Ala Cys Leu Val Lys Asp Phe Tyr Pro Lys Glu Val Thr Ile
20 25 30

Ser Leu Arg Ser Ser Lys Lys Ile Val Glu Phe Asp Pro Ala Ile Val
35 40 45

Ile Ser Pro Ser Gly Lys Tyr Ser Ala Val Lys Leu Gly Gln Tyr Gly
50 55 60

Asp Ser Asn Ser Val Thr Cys Ser Val Gln His Asn Ser Glu Thr Val
65 70 75 80

His Ser Thr Asp Phe Glu Pro Tyr Ala Asn Ser Phe Asn Asn Glu Lys
85 90 95

Leu Pro Glu Pro Glu Asn Asp Thr Gln Ile Ser Glu Pro Cys Tyr Gly
100 105 110

Pro Arg Val Thr Val His Thr Glu Lys Val Asn Met Met Ser Leu Thr
115 120 125

Val Leu Gly Leu Arg Leu Leu Phe Ala Lys Thr Ile Ala Ile Asn Phe
130 135 140

Leu Leu Thr Val Lys Leu Phe Phe
145 150

<210> 17
<211> 172
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Lys Gln Leu Asp Ala Asp Val Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu Pro
1 5 10 15

Ser Ile Ala Glu Thr Lys Leu Gln Lys Ala Gly Thr Tyr Leu Cys Leu
20 25 30

Leu Glu Lys Phe Phe Pro Asp Val Ile Lys Ile His Trp Gln Glu Lys
35 40 45

Lys Ser Asn Thr Ile Leu Gly Ser Gln Glu Gly Asn Thr Met Lys Thr
50 55 60

Asn Asp Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Lys Ser
65 70 75 80

Leu Asp Lys Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn Asn Lys Asn
85 90 95

Gly Val Asp Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr Asp Val Ile
100 105 110

Thr Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu
115 120 125

Leu Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu
130 135 140

Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu
145 150 155 160

Arg Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
165 170

<210> 18
<211> 109
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Lys Gln Leu Asp Ala Asp Val Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu Pro
1 5 10 15

Ser Ile Ala Glu Thr Lys Leu Gln Lys Ala Gly Thr Tyr Leu Cys Leu
20 25 30

Leu Glu Lys Phe Phe Pro Asp Ile Ile Lys Ile His Trp Gln Glu Lys
35 40 45

Lys Ser Asn Thr Ile Leu Gly Ser Gln Glu Gly Asn Thr Met Lys Thr
50 55 60

Asn Asp Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Glu Ser
65 70 75 80

Leu Asp Lys Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn Asn Lys Asn
85 90 95

Gly Ile Asp Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr
100 105

<210> 19
<211> 204

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

```
Lys Gln Leu Asp Ala Asp Val Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu Pro
1               5                  10                  15

Ser Ile Ala Glu Thr Lys Leu Gln Lys Ala Gly Thr Tyr Leu Cys Leu
            20                  25                  30

Leu Glu Lys Phe Phe Pro Asp Ile Ile Lys Ile His Trp Gln Glu Lys
        35                  40                  45

Lys Ser Asn Thr Ile Leu Gly Ser Gln Glu Gly Asn Thr Met Lys Thr
    50                  55                  60

Asn Asp Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Glu Ser
65                  70                  75                  80

Leu Asp Lys Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn Asn Lys Asn
                85                  90                  95

Gly Ile Asp Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr Asp Val Thr
            100                 105                 110

Thr Val Asp Pro Lys Asp Ser Tyr Ser Lys Asp Ala Asn Asp Val Thr
        115                 120                 125

Thr Val Asp Pro Lys Tyr Asn Tyr Ser Lys Asp Ala Asn Asp Val Ile
    130                 135                 140

Thr Met Asp Pro Lys Asp Asn Trp Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu
145                 150                 155                 160

Leu Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu
                165                 170                 175

Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu
            180                 185                 190

Gly Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
        195                 200
```

<210> 20
<211> 171
<212> **PRT**
<213> *Mus musculus*

<400> 20

```
Lys Arg Leu Asp Ala Asp Ile Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu Pro
1               5                  10                  15

Ser Val Ala Glu Thr Asn Leu His Lys Thr Gly Thr Tyr Leu Cys Leu
            20                  25                  30

Leu Glu Lys Phe Phe Pro Asp Val Ile Arg Val Tyr Trp Lys Glu Lys
        35                  40                  45

Asp Gly Asn Thr Ile Leu Asp Ser Gln Glu Gly Asp Thr Leu Lys Thr
    50                  55                  60

Asn Asp Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Arg Ala
65                  70                  75                  80

Met Gly Lys Glu His Arg Cys Ile Val Lys His Glu Asn Asn Lys Gly
                85                  90                  95

Gly Ala Asp Gln Glu Ile Phe Phe Pro Ser Ile Lys Lys Val Ala Val
            100                 105                 110

Ser Thr Lys Pro Thr Thr Cys Trp Gln Asp Lys Asn Asp Val Leu Gln
        115                 120                 125

Leu Gln Phe Thr Ile Thr Ser Ala Tyr Tyr Thr Tyr Leu Leu Leu Leu
    130                 135                 140

Leu Lys Ser Val Ile Tyr Leu Ala Ile Ile Ser Phe Ser Leu Leu Arg
145                 150                 155                 160

Arg Thr Ser Val Cys Gly Asn Glu Lys Lys Ser
                165                 170
```

<210> 21
<211> 166
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 21

```
Lys Arg Leu Asp Ala Asp Ile Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu Pro
1               5                  10                  15

Ser Val Ala Glu Thr Asn Leu His Lys Thr Gly Thr Tyr Leu Cys Leu
            20                  25                  30
```

Leu Glu Lys Phe Phe Pro Asp Val Ile Arg Val Tyr Trp Lys Glu Lys
35 40 45

Asn Gly Asn Thr Ile Leu Asp Ser Gln Glu Gly Asp Thr Leu Lys Thr
50 55 60

Lys Gly Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Arg Ala
65 70 75 80

Met Gly Lys Glu His Ser Cys Ile Val Lys His Glu Asn Asn Lys Gly
85 90 95

Gly Ala Asp Gln Glu Ile Phe Phe Pro Ser Ile Lys Lys Val Ala Thr
100 105 110

Thr Cys Trp Gln Asp Lys Asn Asp Val Leu Gln Phe Gln Phe Thr Ser
115 120 125

Thr Ser Ala Tyr Tyr Thr Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Ile
130 135 140

Tyr Leu Ala Ile Ile Ser Phe Ser Leu Leu Arg Arg Thr Ser Val Cys
145 150 155 160

Gly Asn Glu Lys Lys Ser
165

<210> 22
<211> 171
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 22

Lys Lys Leu Asp Ala Asp Ile Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu Pro
1 5 10 15

Ser Val Ala Glu Thr Asn Leu His Lys Thr Gly Thr Tyr Leu Cys Val
20 25 30

Leu Glu Lys Phe Phe Pro Asp Val Ile Arg Val Tyr Trp Lys Glu Lys
35 40 45

Lys Gly Asn Thr Ile Leu Asp Ser Gln Glu Gly Asp Met Leu Lys Thr
50 55 60

Asn Asp Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Arg Ser
65 70 75 80

Met Gly Lys Glu His Arg Cys Ile Val Lys His Glu Asn Asn Lys Gly
85 90 95

Gly Ala Asp Gln Glu Ile Phe Phe Pro Thr Ile Lys Lys Val Ala Val
100 105 110

Ser Thr Lys Pro Thr Thr Cys Trp Gln Asp Lys Asn Asp Val Leu Gln
115 120 125

Leu Gln Phe Thr Ile Thr Ser Ala Tyr Tyr Thr Tyr Leu Leu Leu Leu
130 135 140

Leu Lys Ser Val Ile Tyr Leu Ala Ile Ile Ser Phe Ser Leu Leu Arg
145 150 155 160

Arg Thr Ser Val Cys Cys Asn Glu Lys Lys Ser
165 170

<210> 23
<211> 166
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 23

Lys Arg Leu Asp Ala Asp Ile Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu Pro
1 5 10 15

Ser Val Ala Glu Thr Asn Leu His Lys Thr Gly Thr Tyr Leu Cys Leu
20 25 30

Leu Glu Lys Phe Phe Pro Asp Val Ile Arg Val Tyr Trp Lys Glu Lys
35 40 45

Asn Gly Asn Thr Ile Leu Asp Ser Gln Glu Gly Asp Thr Leu Lys Thr
50 55 60

Lys Gly Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Arg Ala
65 70 75 80

Met Gly Lys Glu His Ser Cys Ile Val Lys His Glu Asn Asn Lys Gly
85 90 95

Gly Ala Asp Gln Glu Ile Phe Phe Pro Ser Ile Lys Lys Val Ala Thr
100 105 110

Thr Cys Trp Gln Asp Lys Asn Asp Val Leu Gln Phe Gln Phe Thr Ser
115 120 125

```
Thr Ser Ala Tyr Tyr Thr Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Ile
    130                 135                 140

Tyr Leu Ala Ile Ile Ser Phe Ser Leu Leu Arg Arg Thr Ser Val Cys
145                 150                 155                 160

Gly Asn Glu Lys Lys Ser
                165
```

REIVINDICACIONES

1. Método para obtener una preparación enriquecida en células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos, que comprende las etapas de:

a) proporcionar una mezcla de células T que comprende

- células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos que comprenden una región constante murinizada, en donde se suprime la expresión de receptores endógenos de células T alfa beta; y
- células T no modificadas por ingeniería genética con receptores de células T alfa beta endógenos, en donde la etapa a) comprende la etapa de:

i. proporcionar células T;
ii. proporcionar un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican un receptor inmunitario exógeno;
iii. introducir el ácido nucleico o los ácidos nucleicos en las células T para proporcionar de esta manera una mezcla de células T que comprende células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos y células T no modificadas por ingeniería genética con receptores de células T alfa beta endógenos;

b) poner en contacto la mezcla de células T con un anticuerpo que se une específicamente al receptor endógeno de células T alfa beta, para permitir la formación de un complejo de células T de anticuerpos no modificados por ingeniería;
c) retirar el complejo anticuerpo-células T no modificadas por ingeniería genética de la mezcla de células T para obtener de esta manera una preparación enriquecida en células T modificadas por ingeniería genética con receptores inmunitarios exógenos.

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico o los ácidos nucleicos además de codificar el receptor inmunitario exógeno no codifican un marcador de selección expresado por separado.

3. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el receptor inmunitario exógeno es un receptor de células T alfa beta modificado por ingeniería genética o un receptor de células T gamma delta modificado por ingeniería genética.

4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde las células T modificadas por ingeniería genética y no modificadas por ingeniería genética son células T alfa beta humanas y en donde el anticuerpo es BW242/412.

5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde las células T modificadas por ingeniería genética tienen un receptor de células T alfa beta humano modificado por ingeniería genética, en donde la modificación por ingeniería genética del receptor de células T alfa beta humano comprende la modificación del Dominio 3 de la cadena beta del receptor de células T, en donde preferentemente la modificación comprende la murinización del Dominio 3.

6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el receptor inmunitario exógeno es un receptor de células T gamma delta, preferentemente un receptor de células T gamma delta humano.

7. Una preparación enriquecida en células T modificadas por ingeniería genética que se puede obtener mediante el método de la reivindicación 2.

8. Una preparación enriquecida en células T modificadas por ingeniería genética de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso en un tratamiento médico, preferentemente para su uso en el tratamiento de un cáncer.

9. Un anticuerpo que se une específicamente a un receptor inmunitario exógeno como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o un receptor inmunitario exógeno modificado por ingeniería genética como se define en la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento de sujetos que padecen eventos adversos cuando se tratan con una preparación enriquecida en células T modificadas por ingeniería genética con dicho receptor inmunitario exógeno que puede obtenerse mediante uno cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 1-5.

10. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde los sujetos son humanos y en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.

11. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en donde el anticuerpo induce la muerte celular de las células T modificadas por ingeniería genética.

Figura 1

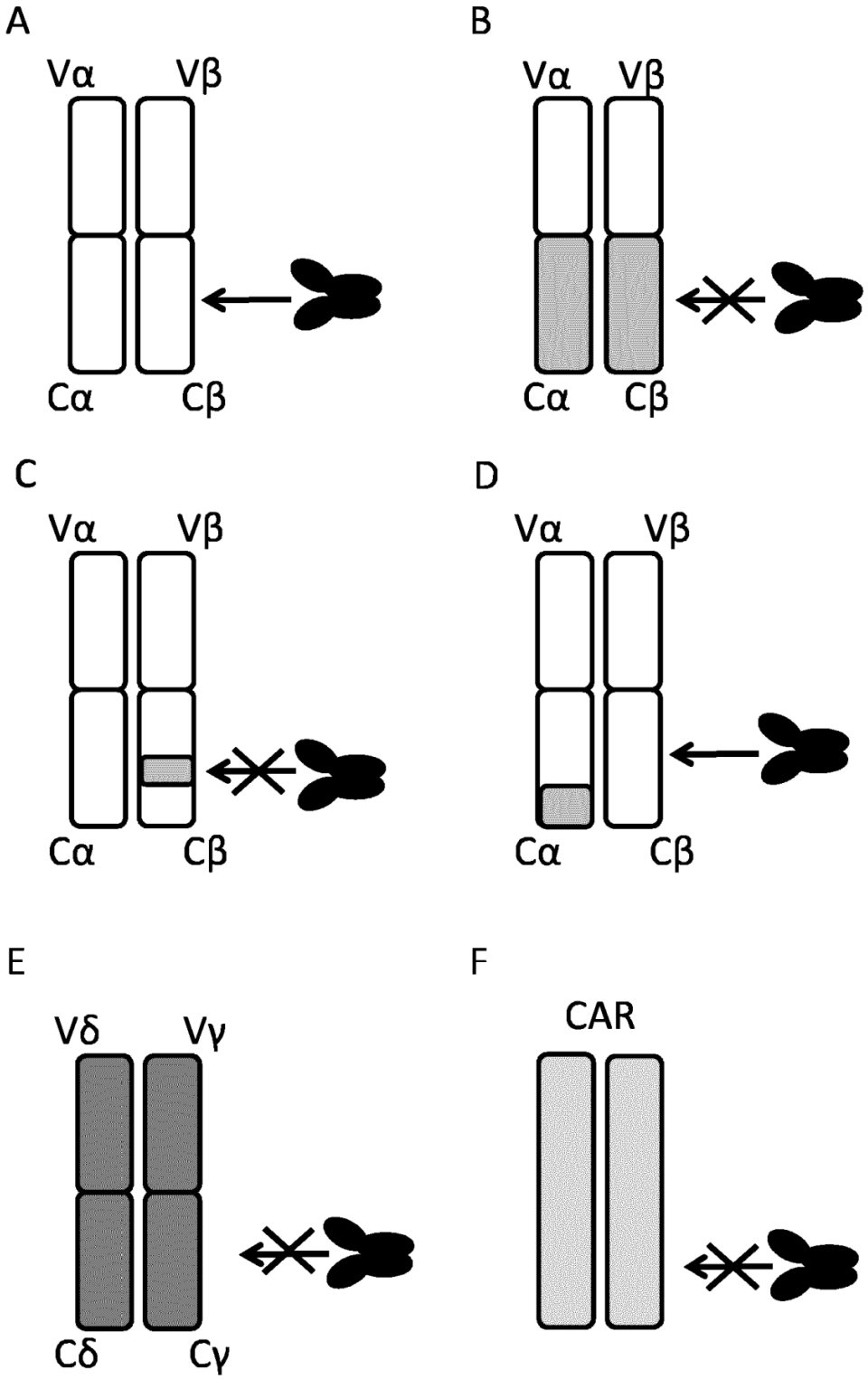


Figura 2

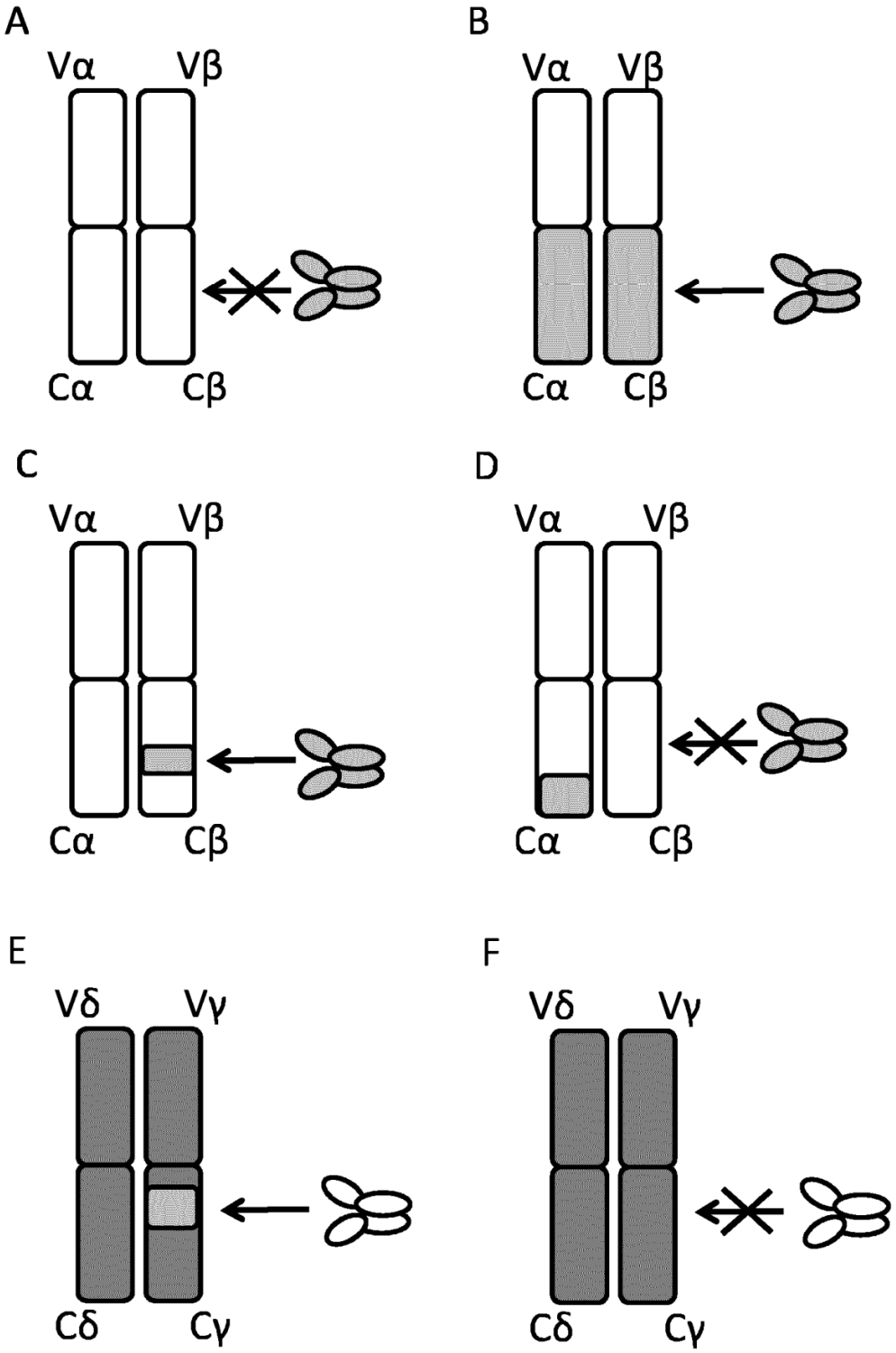

A
Vα
Vβ
Cα
Cβ
B
Vα
Vβ
Cα
Cβ
C
Vα
Vβ
Cα
Cβ
D
Vα
Vβ
Cα
Cβ
E
Vδ
Vγ
Cδ
Cγ
F
Vδ
Vγ
Cδ
Cγ

Figura 3

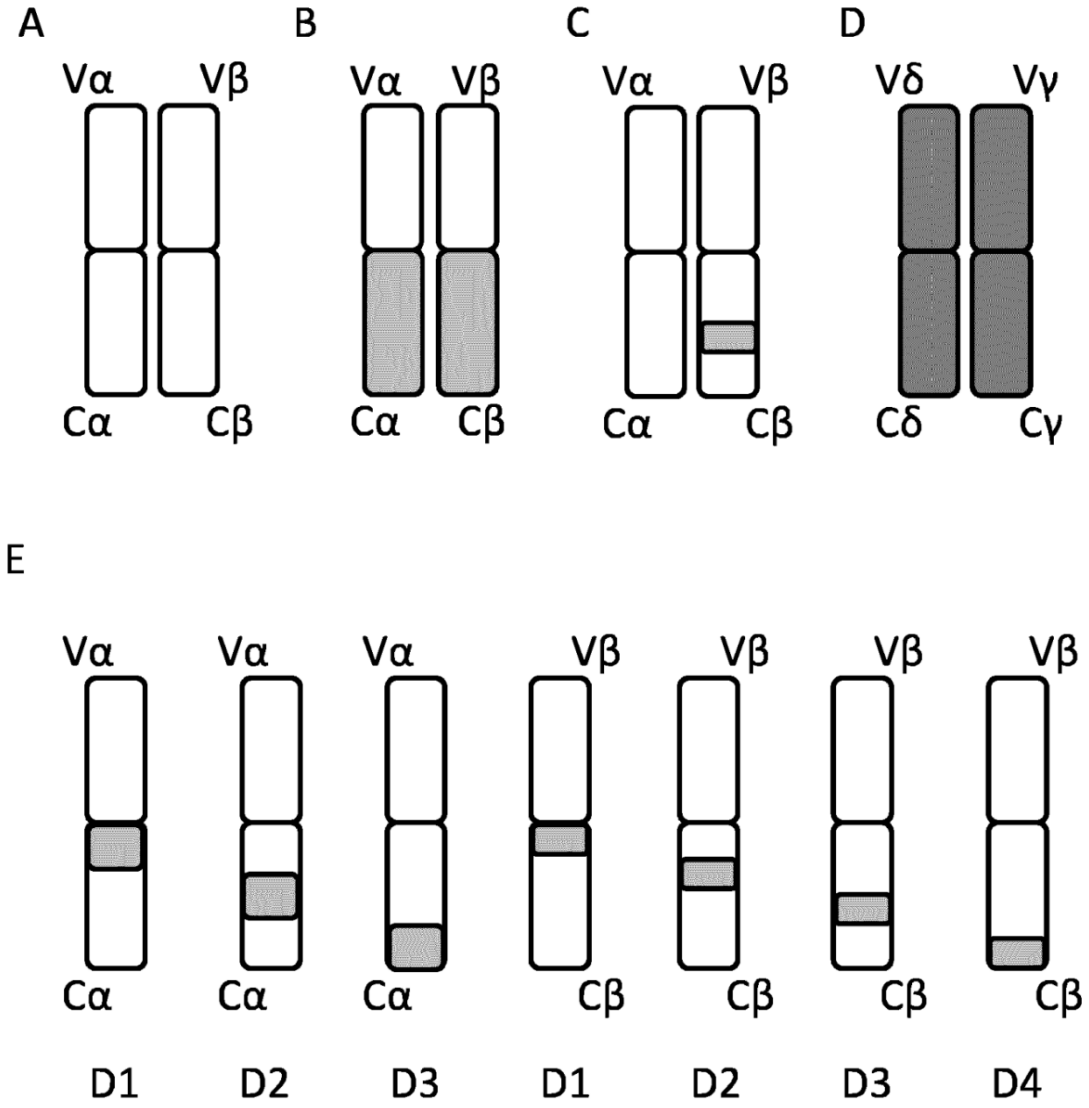

A
Vα
Vβ
Cα
Cβ
B
Vα
Vβ
Cα
Cβ
C
Vα
Vβ
Cα
Cβ
D
Vδ
Vγ
Cδ
Cγ
E
Vα
Vα
Vα
Vβ
Vβ
Vβ
Vβ
Cα
Cα
Cα
Cβ
Cβ
Cβ
Cβ
D1
D2
D3
D1
D2
D3
D4

Figura 4

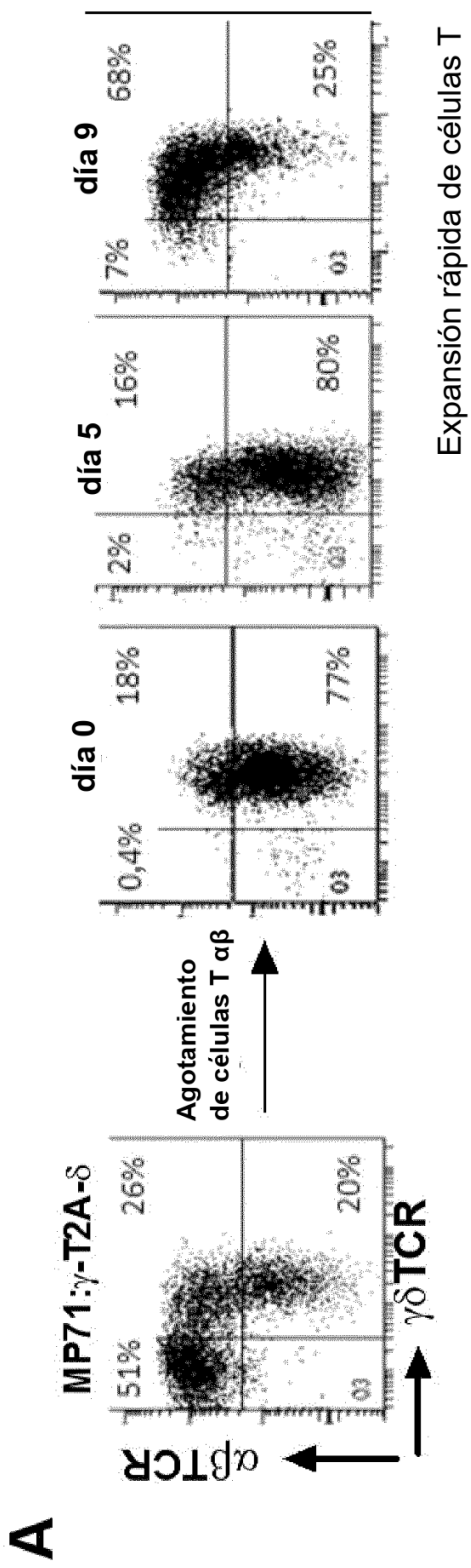

A
αβTCR
γδTCR
MP71:γ-T2A-δ
51%
26%
20%
03
Agotamiento de células T αβ
día 0
0,4%
18%
77%
día 5
2%
16%
80%
día 9
7%
68%
25%
Expansión rápida de células T

Figura 4 (continuación)

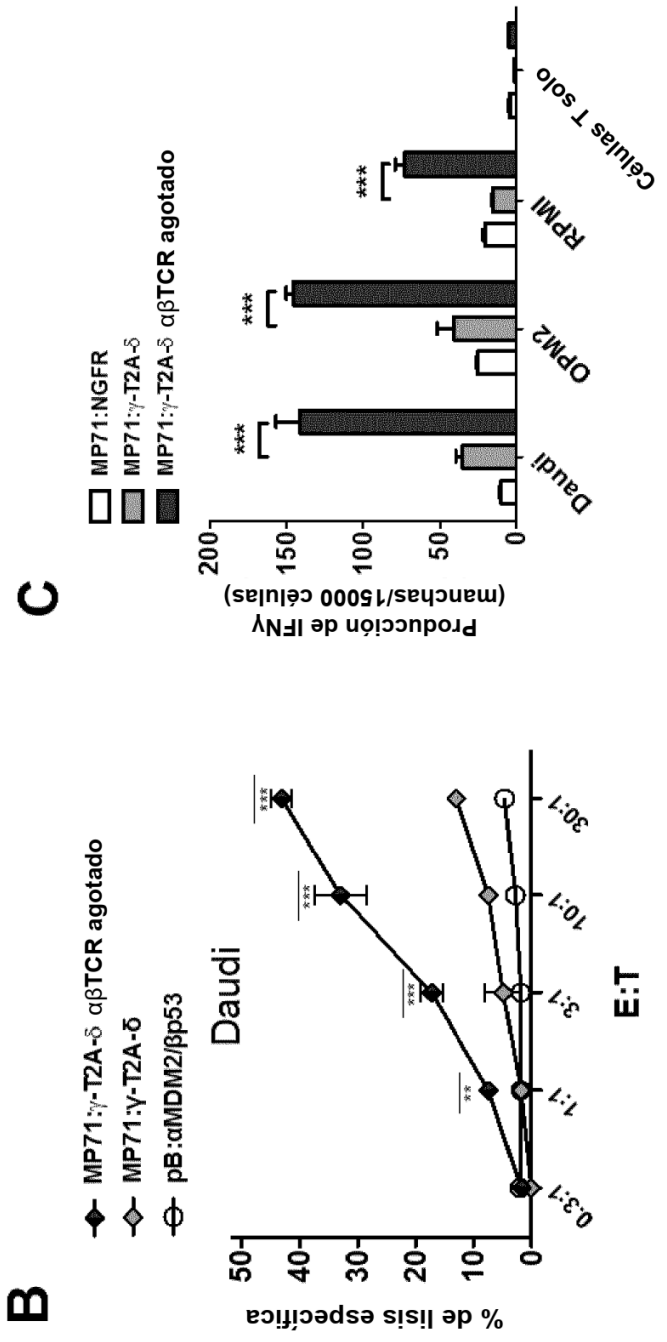


Figura 5

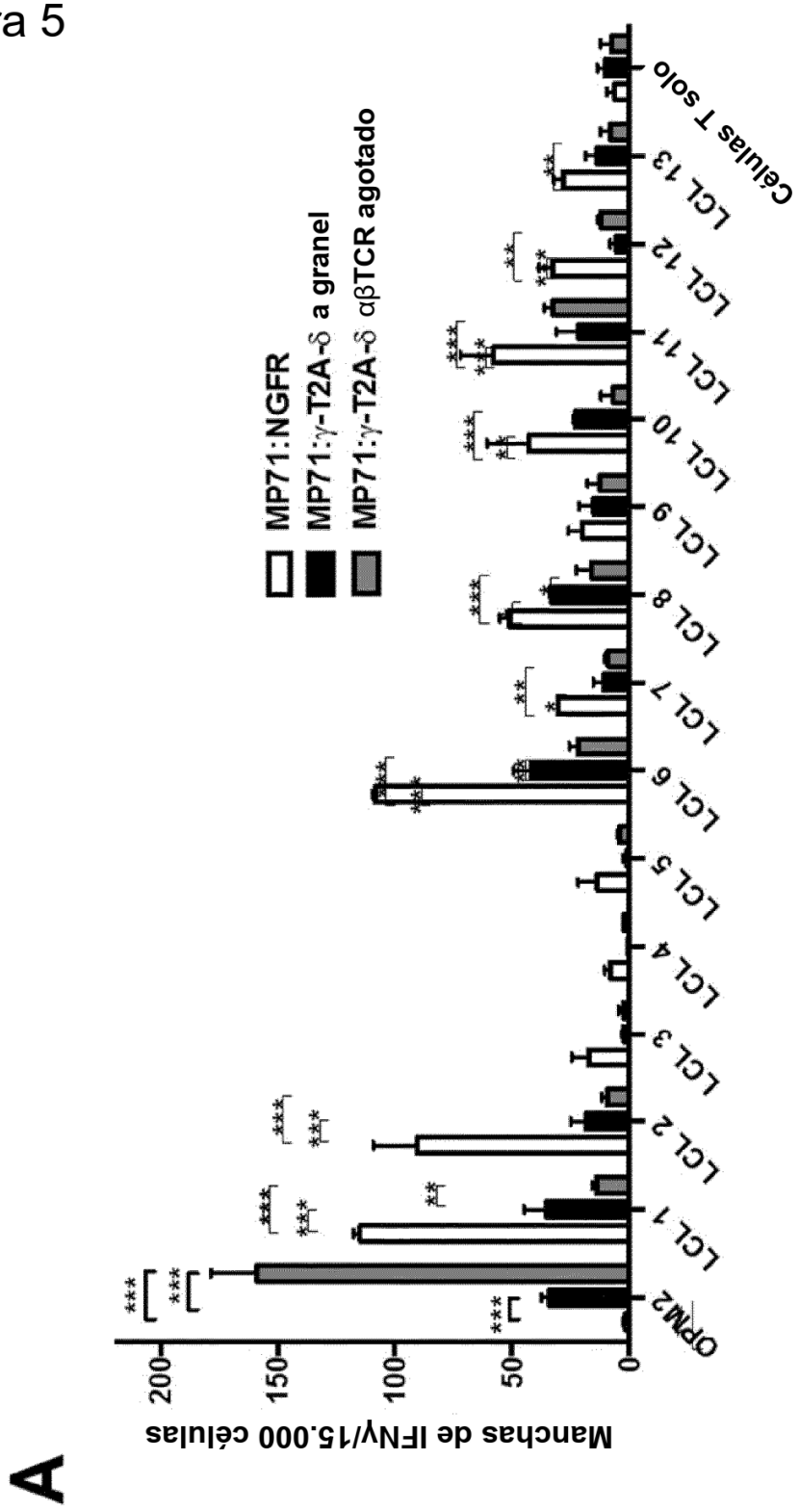

A
Manchas de IFNγ/15.000 células
200
150
100
50
0
MP71:NGFR
MP71:γ-T2A-δ a granel
MP71:γ-T2A-δ αβTCR agotado
OPM2
LCL 1
LCL 2
LCL 3
LCL 4
LCL 5
LCL 6
LCL 7
LCL 8
LCL 9
LCL 10
LCL 11
LCL 12
LCL 13
Células T solo

Figura 6

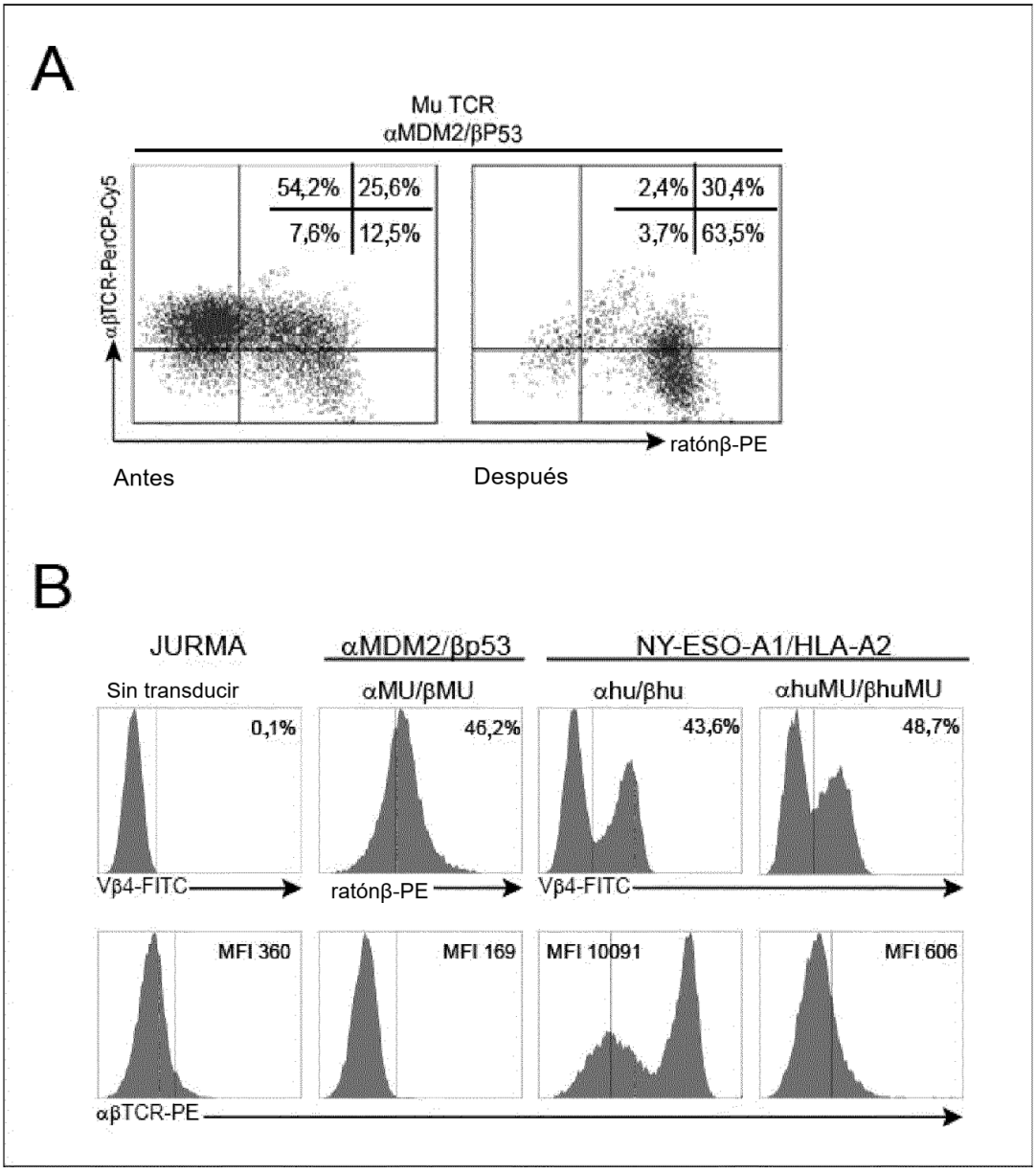

A
Mu TCR
αMDM2/βP53
54,2%
25,6%
7,6%
12,5%
2,4%
30,4%
3,7%
63,5%
αβTCR-PerCP-Cy5
ratónβ-PE
Antes
Después
B
JURMA
αMDM2/βp53
NY-ESO-A1/HLA-A2
Sin transducir
αMU/βMU
αhu/βhu
αhuMU/βhuMU
0,1%
46,2%
43,6%
48,7%
Vβ4-FITC
ratónβ-PE
Vβ4-FITC
MFI 360
MFI 169
MFI 10091
MFI 606
αβTCR-PE

Figura 7

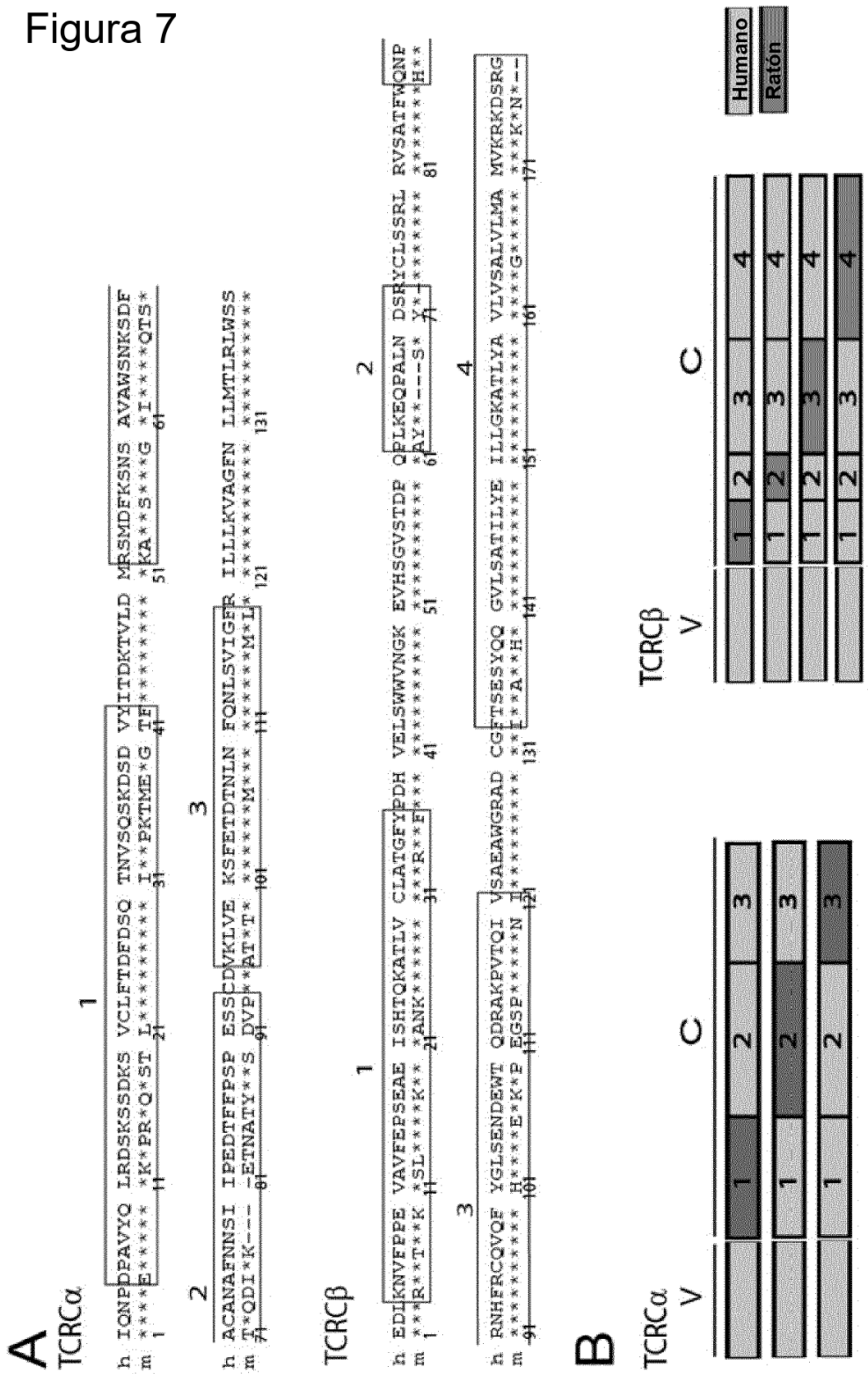


Figura 8

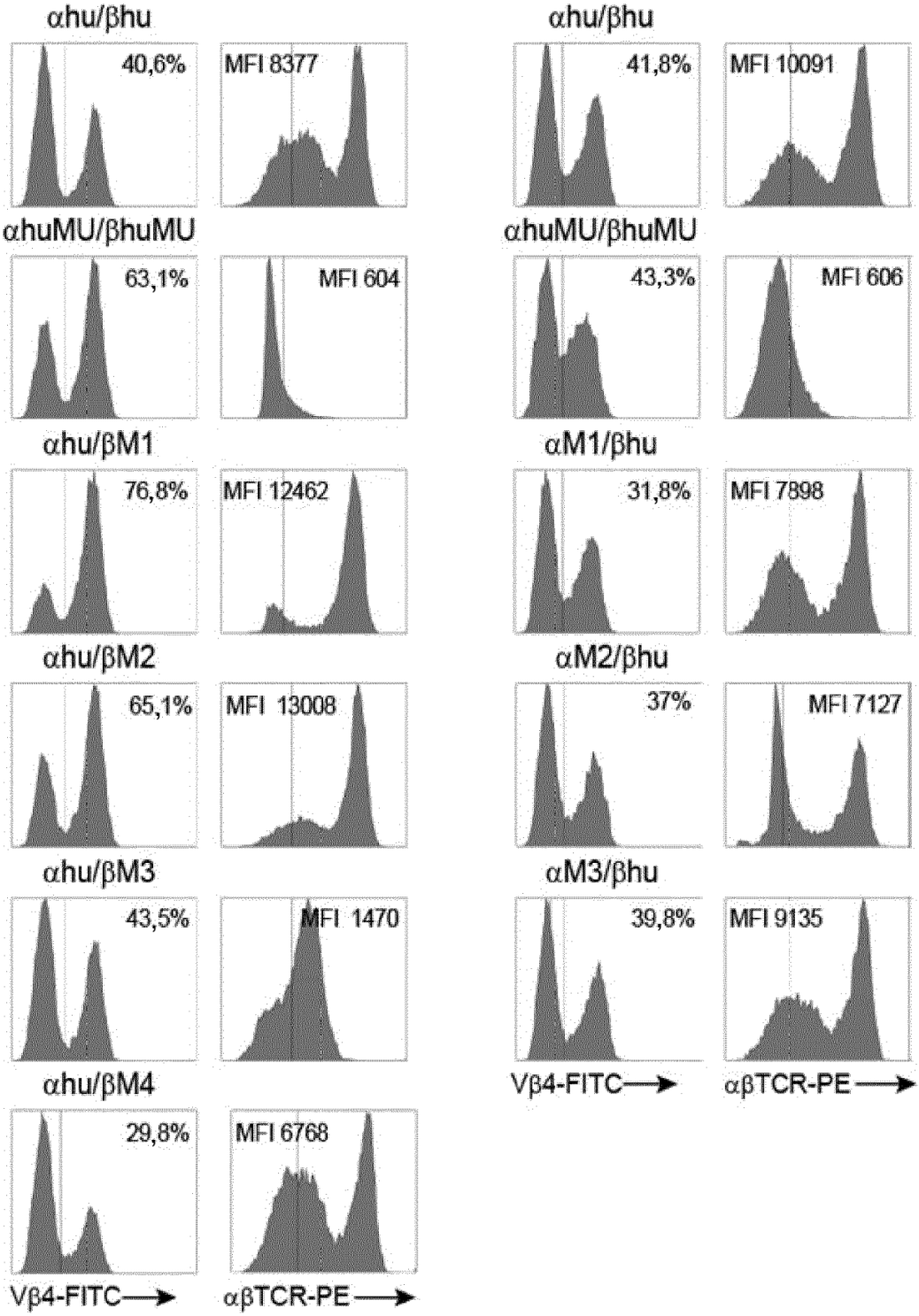

αhu/βhu
40,6%
MFI 8377
αhuMU/βhuMU
63,1%
MFI 604
αhu/βM1
76,8%
MFI 12462
αhu/βM2
65,1%
MFI 13008
αhu/βM3
43,5%
MFI 1470
αhu/βM4
29,8%
MFI 6768
Vβ4-FITC
αβTCR-PE
αhu/βhu
41,8%
MFI 10091
αhuMU/βhuMU
43,3%
MFI 606
αM1/βhu
31,8%
MFI 7898
αM2/βhu
37%
MFI 7127
αM3/βhu
39,8%
MFI 9135
Vβ4-FITC
αβTCR-PE

Figura 9

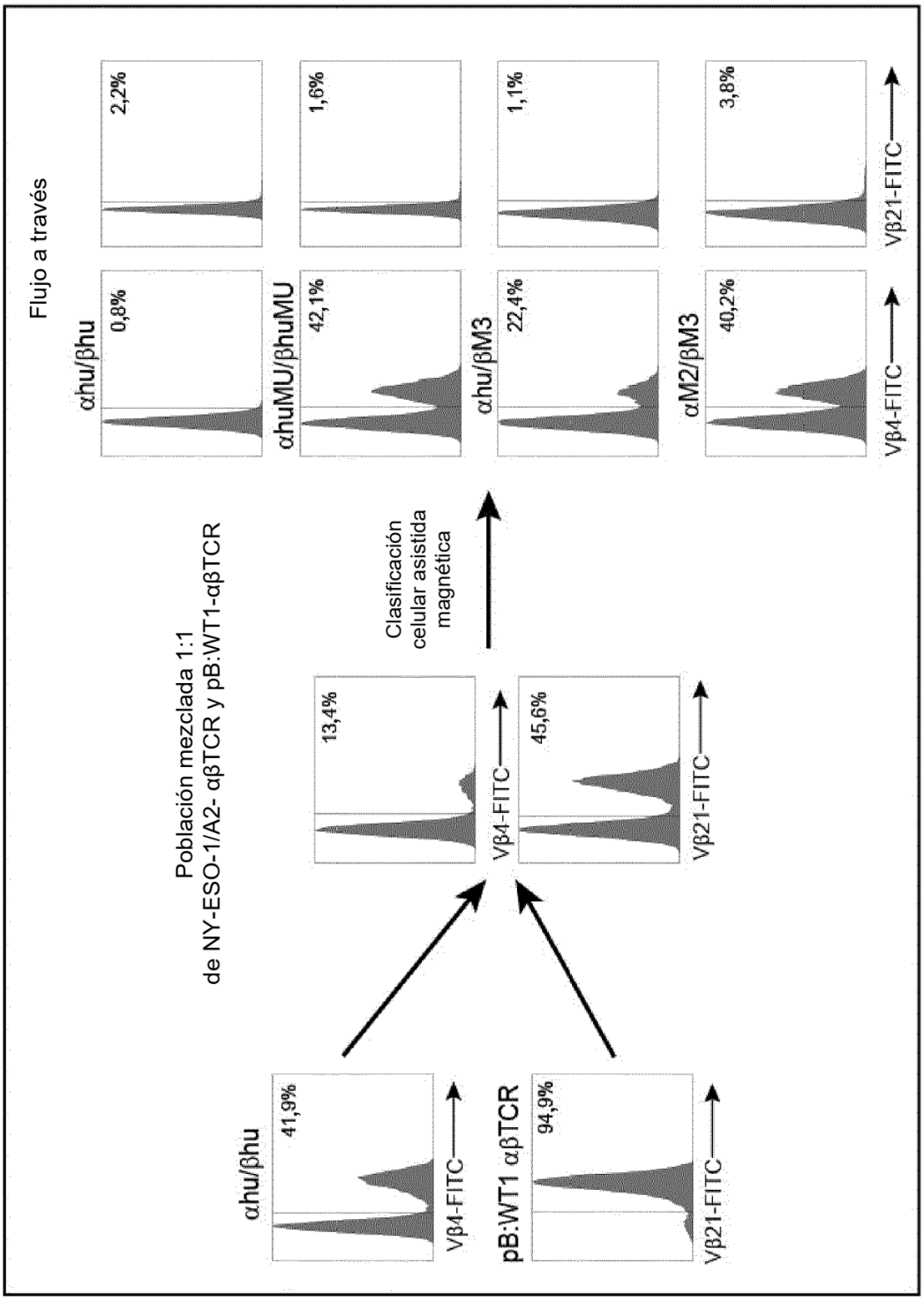
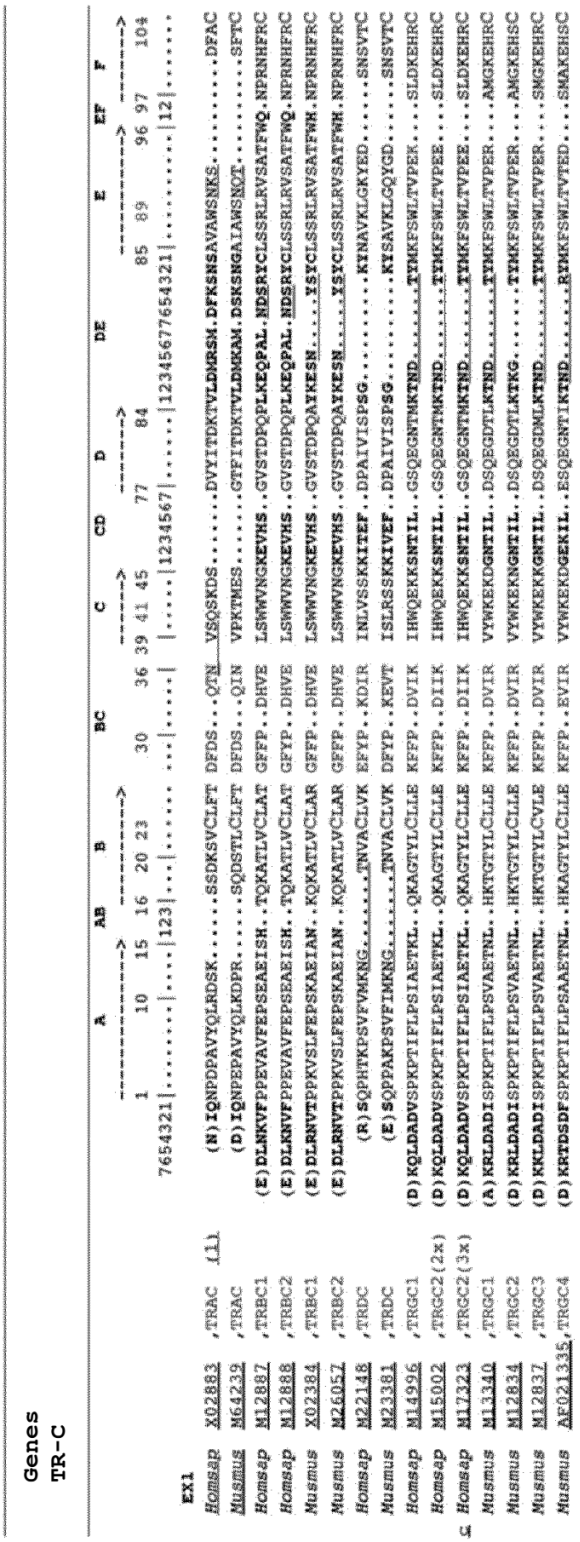

Flujo a través
αhu/βhu
0,8%
2,2%
αhuMU/βhuMU
42,1%
1,6%
αhu/βM3
22,4%
1,1%
αM2/βM3
40,2%
3,8%
Vβ4-FITC
Vβ21-FITC
Clasificación celular asistida magnética
Población mezclada 1:1
de NY-ESO-1/A2- αβTCR y pB:WT1-αβTCR
αhu/βhu
41,9%
pB:WT1 αβTCR
94,9%
13,4%
45,6%

Figura 10


Genes
TR-C
A
AB
B
BC
C
CD
D
DE
E
EF
F
Homsap
Musmus
Homsap
Homsap
Musmus
Musmus
Homsap
Musmus
Homsap
Homsap
Homsap
Musmus
Musmus
Musmus
Musmus