

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 991 652**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2020 PCT/NL2020/050655**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.04.2021 WO21080427**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2020 E 20800349 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2024 EP 4048301**

54 Título: **Polipéptido quimérico para regular las células inmunitarias**

30 Prioridad:

23.10.2019 NL 2024083

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

04.12.2024

73 Titular/es:

**STICHTING HET NEDERLANDS KANKER
INSTITUUT-ANTONI VAN LEEUWENHOEK
ZIEKENHUIS (100.0%)
Plesmanlaan 121
1066 CX Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**SCHUMACHER, ANTONIUS NICOLAAS MARIA y
SAHILLIOGLU, ALI CAN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 991 652 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptido quimérico para regular las células inmunitarias

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a polipéptidos quiméricos químicamente regulados que permiten un control reversible y dependiente de la dosis de la función del receptor de células T y/o del receptor de células NK y/o del receptor de antígenos quiméricos.

Antecedentes de la invención

10 En los últimos años se han desarrollado varias terapias con células T adoptivas para el tratamiento de cánceres hematológicos y tumores sólidos (Rosenberg et al., *Science*. 2015 Apr 3; 348(6230):62-8, June et al., *Science*. 2018 Mar 23; 359(6382):1361-1365). En concreto, tras el descubrimiento del efecto antitumoral de las células T derivadas del donante en el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas, se ha desarrollado la infusión de linfocitos del donante (DLI) como un enfoque para aprovechar este efecto (Frey et al., *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008 Jun; 21(2): 205-222).

15 Más recientemente, se han utilizado células T modificadas con receptores de antígenos quiméricos (CAR) y receptores de células T (TCR) para proporcionar a los pacientes poblaciones de células T reactivas a tumores, y la importante actividad clínica de las células T CAR CD19 en pacientes con neoplasias de células B ha llevado recientemente a la aprobación de estos productos de células T para B-ALL y DLBCL (Boyiadzis et al., *J Immunother Cancer*. 2018 Dec 4; 6(1):137).

20 Es importante destacar que la aplicabilidad más amplia de las terapias de células T adoptivas en el cáncer está actualmente limitada por cuestiones de seguridad. Específicamente, la toxicidad en el objetivo - fuera del tumor se observa a menudo cuando los antígenos a los que se dirige el grupo de células T transferidas adoptivamente también se expresan en el tejido sano (Bonifant et al., *Mol Ther Oncolytics*. 2016 Apr 20;3:16011).

25 En los últimos años, se ha realizado un esfuerzo considerable para descubrir marcadores verdaderamente específicos del cáncer, con el fin de evitar dicha toxicidad en el objetivo - fuera del tumor. Sin embargo, los marcadores estrictamente específicos del cáncer que son expresados por los tumores de una gran fracción de pacientes han demostrado ser extremadamente raros. Además, la reactividad cruzada inesperada de las células T modificadas genéticamente con autoantígenos que muestran una expresión de bajo nivel en el tejido vital se ha asociado a una toxicidad grave (Morgan et al., *J Immunother*. 2013 Feb; 36(2):133-51).

30 Por último, incluso cuando puede lograrse una activación totalmente específica del tumor de las células infundidas, la profunda liberación de citocinas tras el reconocimiento por las células T de una gran masa tumoral puede constituir un problema de seguridad, por lo que sería atractivo disponer de estrategias para ajustar la intensidad de la activación de las células T.

35 El riesgo significativo de toxicidad inducida por el tratamiento en la terapia de células T adoptivas ha llevado a varios grupos a desarrollar conmutadores suicidas codificados genéticamente, como los conmutadores suicidas HSV-TK, iCas9 y de marcadores de superficie celular CD20, que pueden activarse mediante la administración del fármaco en el momento en que se observa toxicidad importante (Jones et al., *Front Pharmacol*. 2014 Nov 27;5:254).

40 Tales conmutadores suicidas han encontrado uso principalmente en el entorno de DLI donde el efecto injerto contra tumor (GvT) está correlacionado con la enfermedad injerto contra huésped (GvHD), y se busca un equilibrio entre estos dos efectos. Sin embargo, la naturaleza binaria de estos conmutadores no permite una titulación de las funciones de las células T y estos sistemas han encontrado un uso limitado en el contexto de las células T modificadas con TCR/CAR.

45 En trabajos más recientes, se han diseñado tecnologías de conmutadores de seguridad que pueden controlar de forma reversible las células T con receptores de antígenos quiméricos (CAR) (Wu et al., *Science*. 2015 Oct 16; 350(6258): aab4077, Ma et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016 Jan 26;113(4): E450-8, Loureiro et al., *Blood Cancer J*. 2018 Sep; 8(9): 81), pero estos sistemas no pueden utilizarse para controlar la actividad de las células T modificadas o no modificadas por el TCR. El documento WO 2016/193696 A1 divulga la fusión de un dominio SH2 con un dominio que contiene ITIM. La proteína de fusión se utiliza para modular las vías de transducción de señales en las células T, por ejemplo, a través de CAR.

50 También se ha observado GvHD aguda en un ensayo clínico en el que se trató a pacientes con terapia de células NK sin células T, lo que sugiere que también es deseable un conmutador de seguridad para controlar la actividad de las células NK (Shah et al., *Blood*. 2015 Jan 29;125(5):784-92).

A la luz de esto, los productos, composiciones, métodos y usos para controlar la función de células T TCR y CAR y la función de células asesinas naturales (NK) (es decir, el funcionamiento del receptor de células NK),

en particular en pacientes, serían altamente deseables, pero aún no están fácilmente disponibles. En particular, existe una clara necesidad en la técnica de productos, composiciones, métodos y usos fiables, eficaces y reproducibles que permitan controlar la función de las células TCR/CAR y las células NK, tal como la actividad citotóxica de dichas células T que comprenden TCR o CAR, el receptor de células NK (NKR) o las células NK que comprenden CAR y/o de controlar la secreción de citocinas por dichas células T o células NK. En consecuencia, el problema técnico subyacente a la presente invención puede verse en la provisión de tales productos, composiciones, métodos y usos para cumplir con cualquiera de las necesidades antes mencionadas. El problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y en el presente documento a continuación.

10 Descripción detallada de la invención

Breve descripción de los dibujos

Las realizaciones de la invención se describen más adelante con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

Figura 1: Supresión eficaz de la función de las células T mediante el reclutamiento de la cola de PD1 mediado por Zap70 SH2. (A) Diagrama esquemático de las primeras etapas en la vía de transducción de señales del TCR, que muestra el reclutamiento de Zap70 a la cadena ζ de CD3 tras el enganche del péptido del MHC y la inhibición de la señalización del TCR mediada por PD1 tras la ligadura de PD-L1. (B) Diagrama esquemático del reclutamiento mediado por Zap70 SH2 de la cola de PD1 al complejo TCR activado y la inhibición resultante de la señalización de TCR. (C-D) Células T humanas primarias modificadas con el TCR CDK4 restringido a HLA clase I y los dominios Zap70-PD1, 2xSH2 de Zap70, la cola PD1 o el control del vector se cultivaron juntamente con células T2 cargadas con el péptido CDK4. (C, D) Los datos muestran la producción de IFN γ , IL2, TNF α y la expresión de LAMP1 en la superficie celular de células T CD8+ altas en EGFP TCR+ CDK4 (C) y CD4+ (D).

Figura 2: Control de la función de las células T. Diagrama esquemático de la proteína de fusión Zap70-PD1-SMASH en ausencia (A) o presencia (B) de asunaprevir. En ausencia de asunaprevir, la proteasa del HCV libera la fracción Zap70-PD1 para permitir la inhibición de la señalización del TCR. En presencia de asunaprevir, se impide la liberación y la proteína de fusión se dirige al proteasoma, eliminando así la inhibición de la función de las células T. (C-D) Tinción de HA intracelular de células T humanas primarias modificadas con un conmutador Zap70-PD1-SMASH marcado con HA en el terminal N o control de vector. El efecto de la exposición previa al asunaprevir durante 24 horas sobre la señal de HA se representa para células T CD8+ (C) y CD4+ (D) con EGFP alta. (E-H) Células T humanas primarias modificadas con el TCR CDK4 restringido a HLA clase I y el conmutador Zap70-PD1-SMASH (E, G), o el control del vector (F, H), se pretrataron con 10 μ M de asunaprevir o DMSO de control. Los datos muestran la expresión intracelular de IFN γ , IL2, TNF α y LAMP1 en la superficie celular de células T CD8+ CDK4 TCR+ con EGFP alta (E-F) y CD4+ (G-H) tras el cultivo conjunto con células T2 cargadas con el péptido CDK4 en presencia o ausencia continuada de asunaprevir. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

Figura 3: Control bidireccional titulable de la función de las células T. (A) Diagrama esquemático del montaje experimental. Las células T humanas primarias modificadas con el TCR CDK4 restringido a HLA clase I y el control Zap70-PD1 o vector se pretrataron durante 24 horas con las concentraciones de asunaprevir indicadas en B-D y luego se utilizaron directamente (B-C) o se cultivaron durante 72 horas en ausencia del fármaco (D). (B-C) Efecto del tratamiento con asunaprevir sobre el rendimiento funcional de las células T CD8+ (B) y CD4+ (C) tras el cultivo conjunto con células T2 cargadas con el péptido CDK4 10 nM en presencia o ausencia continuada de las concentraciones de asunaprevir indicadas. (D) Las células T pretratadas con 2.5 μ M de asunaprevir o control de DMSO se cultivaron durante 72 horas en ausencia de fármaco y, a continuación, se trataron con 2.5 μ M de asunaprevir o control de DMSO y se cultivaron juntamente con células T2 cargadas con péptido CDK4 10 nM en presencia o ausencia continuada de fármaco. Obsérvese que un primer tratamiento con asunaprevir no impide la inhibición posterior de la función de las células T por el conmutador en ausencia de fármaco (compárese +/- y -/-), y que la liberación de la inhibición por asunaprevir no se ve influida por la liberación previa de la inhibición (compárese -/+ y +/+). (B-D) Los datos muestran la expresión intracelular de IFN γ , IL2, TNF α y LAMP1 en la superficie celular. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

Figura 4: Los PROTAC pueden utilizarse para regular la actividad de las células T en la plataforma CRASH-IT. Diagrama esquemático de la proteína de fusión Zap70-PD1-FKBP12^{F36V} en ausencia (A) o presencia (B) de PROTAC dTAG-13. (C-E) Células T humanas primarias modificadas con el TCR CDK4 y Zap70-PD1-SMASH, Zap70-PD1-FKBP12^{F36V} o control del vector fueron pretratadas con las concentraciones indicadas de inhibidores de la proteasa NS3/4A del HCV asunaprevir (C) o grazoprevir (D), o dTAG-13 (E). Los datos muestran la expresión intracelular de IFN γ , IL2, TNF α y LAMP1 en la superficie celular de las células T CD8+ CDK4 TCR+ con alto contenido de EGFP en cultivo conjunto con células tumorales NKIRTL006 que expresan el epítipo CDK4 en presencia continua de las concentraciones indicadas de asunaprevir, grazoprevir o dTAG-13. (F-G) Regulación de la citotoxicidad de células T con un conmutador Zap70-PD1-FKBP12^{F36V} inducido por una molécula pequeña. Células T humanas primarias modificadas con el TCR CDK4 restringido a HLA clase I y Zap70-PD1-FKBP12^{F36V} (F) o control del vector (G) fueron seleccionadas para CD8+ y alta expresión de EGFP, expandidas por REP y pretratadas con 0.5 μ M de dTAG-13 o DMSO. Los datos muestran la liberación de ⁵¹Cr de células tumorales NKIRTL006 marcadas tras el cultivo conjunto con células T CD8+ CDK4 TCR+

con alto contenido de EGFP seleccionadas en presencia o ausencia continuada de dTAG-13. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

5 Figure 5: Control de la función de las células CAR-T mediante CRASH-IT. (A) Diagrama esquemático de la segunda generación de CAR anti-CD19-CD28-CD3 ζ interactuando con el conmutador Zap70-PD1-SMASH. (B) Expresión de CD19 en tumores K562, Daudi y Raji. Las células se tiñeron con anti-CD19-PE (línea continua) o con el control del isotipo-PE (línea discontinua). (C-F) Células T humanas primarias modificadas con el CAR anti-CD19-CD28-CD3 ζ y Zap70-PD1-SMASH (C, E), o control del vector (D, F) fueron pretratadas con 10 μ M de asunaprevir o control de DMSO. Los datos muestran la expresión intracelular de IFN γ , IL2, TNF α y LAMP1 en la superficie celular de células T CAR+ con alto contenido de EGFP CD8+ (C-D) y CD4+ (E-F) tras el cultivo conjunto con células tumorales K562 negativas para CD19 o Daudi o Raji positivas para CD19 en presencia o ausencia continuada de asunaprevir. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

15 Figura 6: Control de la función de las células TCR NY-ESO-1 por CRASH-IT. (A-D) Células T humanas primarias modificadas con el TCR NY-ESO-1 restringido a HLA clase I de afinidad intermedia y el conmutador Zap70-PD1-SMASH (A, C), o control del vector (B, D), fueron pretratadas con 10 μ M de asunaprevir o control de DMSO. Los datos muestran la expresión intracelular de IFN γ , IL2, TNF α y LAMP1 en la superficie celular de células T CD8+ NY-ESO-1 TCR+ con alto contenido de EGFP (A-B) y CD4+ (C-D) tras el cultivo conjunto con células T2 cargadas con péptido NY-ESO-1 en presencia o ausencia continuada de asunaprevir. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

20 Figura 7: Ajuste de los conmutadores inhibitorios mediante modificación del terminal N. (A-B) Células T humanas primarias modificadas con el TCR CDK4 restringido a HLA clase I y Zap70-PD1-SMASH, alanina del terminal N añadida (ajustada) tuZap70-PD1-SMASH o control del vector fueron pretratadas con 10 μ M de asunaprevir o control de DMSO. Los datos muestran la expresión intracelular de IFN γ , IL2, TNF α y LAMP1 en la superficie celular de células T CD8+ (A) y CD4+ (B) CDK4+ TCR+ con alto contenido de EGFP tras el cultivo conjunto con células tumorales NKIRTL006 en presencia o ausencia continuada de asunaprevir. Obsérvese que el conmutador tuZap70-PD1-SMASH produce una inhibición casi equivalente de la función de las células T CD4+ en ausencia de asunaprevir y una restauración sustancialmente mayor de la función de las células T en presencia de asunaprevir. (C-D) Células T humanas primarias modificadas con el TCR CMV restringido a HLA clase II y tuZap70-PD1-SMASH (C), o control del vector (D), fueron pretratadas con 10 μ M de asunaprevir o control de DMSO. Los datos muestran la expresión intracelular de IFN γ , IL2, TNF α y LAMP1 en la superficie celular de las células T CD4+ CMV TCR+ con alto contenido de EGFP en cultivo conjunto con células CBH 5477 cargadas con péptido del CMV en presencia o ausencia continuada de asunaprevir. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

30 Figura 8: En la plataforma CRASH-IT se pueden utilizar diferentes ITIM/ITSM que contengan colas inhibitorias para controlar la actividad de las células TCR T. Células T humanas primarias modificadas con TCR CDK4 restringidas a HLA clase I y realizaciones con CRASH-IT que contienen Zap70 (2xSH2)-X-SMASH, donde X puede ser o bien ninguna cola inhibitoria o colas inhibitorias (o dominios citoplasmáticos/dominios intracelulares/endodominios) de PD1, BTLA, SIRPA, SIGLEC5, SIGLEC9, SIGLEC11, PECAM1 o LY9, o control del vector se pretrataron con 10 μ M de asunaprevir o control de DMSO. (A) Posiciones de poblaciones con contenido intermedio de EGFP y alto contenido de EGFP de células T. Los datos muestran la expresión intracelular de IFN γ , IL2, TNF α y LAMP1 en la superficie celular de células T CDK4 TCR+ con contenido intermedio de EGFP (B-C) y con alto contenido de EGFP (D-E), CD8+ (B, D) y CD4+ (C, E) tras el cultivo conjunto con células tumorales NKIRTL006 en presencia o ausencia continuada de asunaprevir. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

35 Figura 9. En la plataforma CRASH-IT pueden utilizarse diferentes ITIM/ITSM que contengan colas inhibitorias para controlar la actividad de las células T CAR. Células T humanas primarias modificadas con realizaciones con CAR anti-CD19-CD28-CD3 ζ de segunda generación y CRASH-IT que contienen Zap70 (2xSH2)-X-SMASH, donde X puede ser o bien ninguna cola inhibitoria o colas inhibitorias (o dominios citoplasmáticos/dominios intracelulares/endodominios) de PD1, BTLA, SIRPA, SIGLEC5, SIGLEC9, SIGLEC11, PECAM1 o LY9, o control del vector fueron pretratados con 10 μ M de asunaprevir o control de DMSO. (A) Posiciones de poblaciones con contenido intermedio de EGFP y alto contenido de EGFP de células T. Los datos muestran la expresión intracelular de IFN γ , IL2, TNF α y LAMP1 en la superficie celular de células T CDK4 TCR+ con contenido intermedio de EGFP (B-C) y con alto contenido de EGFP (D-E), CD8+ (B, D) y CD4+ (C, E) tras el cultivo conjunto con células tumorales Daudi en presencia o ausencia continuada de asunaprevir. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

40 Figura 10: En la plataforma CRASH-IT pueden utilizarse dominios de acoplamiento alternativos que contengan SH2. Células T humanas primarias modificadas con el TCR CDK4 restringido a HLA clase I y Zap70 (2xSH2)-cola PD1-SMASH, Syk (2xSH2)-cola PD1-SMASH, Lck (SH4-Único-SH3-SH2)-cola PD1-SMASH o control del vector fueron pretratadas con 10 μ M de asunaprevir o control de DMSO. Los datos muestran la expresión intracelular de IFN γ , IL2, TNF α y LAMP1 en la superficie celular de las células T CD8+ CDK4 TCR+ con alto contenido de EGFP tras el cultivo conjunto con células tumorales NKIRTL006 en presencia o ausencia continuada de asunaprevir. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

Figura 11: Comparación de las secuencias del motivo de cambio basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM, en negrita) y del motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM, subrayado) en los dominios citoplasmáticos de PD1, BTLA, SIRPA, SIGLEC5, SIGLEC9, SIGLEC11, PECAM1 y LY9. La secuencia de consenso de ITSM es TxYxxV/I, mientras que la secuencia de consenso de ITIM es S/I/V/LxYxxI/V/L.

Figura 12: Comparación de las secuencias del motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAM, representado en negrita y subrayado) de la cadena zeta de CD3, la cadena épsilon de CD3, la cadena delta de CD3, la cadena gamma de CD3, la cadena gamma (γ) del receptor de inmunoglobulina FcεRI y DAP12. La secuencia de consenso de ITAM es YxxI/Lx(6-8)YxxI/L.

Figura 13: Control de la función de las células NK por CRASH-IT. La línea celular NK humana KHYG-1 modificada con el conmutador Zap70-PD1-FKBP12^{F36V} o el control del vector se pretrataron con 0.5 μM PROTAC dTAG-13 o el control de DMSO. (A) Posiciones de poblaciones con contenido intermedio de EGFP de células NK. Los datos muestran la expresión intracelular de IFNγ, IL2 y TNFα de las células NK con contenido intermedio de EGFP tras el cultivo conjunto con células tumorales K562 (B) o en ausencia de células K562 (C) en presencia o ausencia continuada de dTAG-13. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

Figura 14: El conmutador CRASH-IT puede combinarse con varios ITAM que contengan CAR. Células T humanas primarias modificadas con (A) Zap70-PD1-FKBP12^{F36V} o (B) control del vector y o bien los CAR CD19 ScFv-CD28 (bisagra+TM)-cadena zeta de CD3, CD19 ScFv-CD28 (bisagra+TM)-FCER1G, CD19 ScFv-cadena épsilon de CD3 (longitud completa), CD19 ScFv-CD28 (bisagra+TM)-cadena épsilon de CD3, o CD19 ScFv-CD28 (bisagra+TM)-DAP12 fueron pretratados con 0.5 μM de dTAG-13 o control de DMSO. (A-B) Los datos muestran la expresión intracelular de IFNγ, IL2, TNFα y LAMP1 en la superficie celular de células T CD8+, con alto contenido de EGFP, CAR+ tras el cultivo conjunto con células tumorales Daudi en presencia o ausencia continuada de dTAG-13. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3).

Figura 15: Diagrama esquemático del conmutador degrón Zap70-PD1-dedo de Zinc (como ejemplo de realización de acuerdo con la invención que emplea un dominio de sustrato de polipéptido CRBN capaz de unirse a la proteína CRBN en respuesta a un fármaco, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico) en ausencia (A) o presencia (B) de IMiD. (A) En ausencia de IMiD, tal como talidomida, lenalidomida o pomalidomida, la proteína de fusión Zap70-PD1-dedo de Zinc es estable e inhibe las funciones de las células T. (B) La presencia de IMiD induce la degradación de la proteína de fusión a través del reclutamiento de la E3 ligasa CRBN y, por lo tanto, resulta en la restauración de la actividad de las células T.

Figura 16: La valoración de IMiD de células CD8 que expresan el conmutador CRASH-IT basado en degrón con dedo de zinc revela diseños con distinta sensibilidad a los fármacos. (A) Secuencias de aminoácidos de los degrones usados dedo de zinc. El degrón con dedo de zinc superior se deriva de la secuencia de IKZF1 ZF2-3. La secuencia de giro beta de IKZF1 ZF2 (mostrada dentro del rectángulo) se sustituyó por secuencias de giro beta de ZNF653 ZF4, ZFP91 ZF4, ZNF276 ZF4 o ZNF827 ZF1, para crear los dedos de zinc híbridos con sensibilidad a IMiD mejorada que se muestran a continuación. Las secuencias individuales de dedos de zinc C2H2 están subrayadas. Células T humanas primarias modificadas con el TCR CDK4 y los degrones de dedo de zinc Zap70-PD1 indicados se pretrataron con las concentraciones indicadas de lenalidomida (B), pomalidomida (C) o talidomida (D). Los datos muestran la expresión intracelular de IFNγ, IL2, TNFα y LAMP1 en la superficie celular de células T CD8+ CDK4 TCR+, con alto contenido de EGFP tras el cultivo conjunto con células tumorales NKIRTL006 en presencia continua de las concentraciones indicadas de lenalidomida, pomalidomida o talidomida. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 2).

Figura 17: El conmutador híbrido CRASH-IT basado en ZFP91/IKZF1 (doble ZF) es altamente eficiente en la restauración de las funciones de las células T en presencia de IMiD. (A) Secuencias de aminoácidos de los degrones dedo de zinc utilizados en el experimento. En el experimento se utilizaron degrones dedo de zinc de tipo silvestre derivados de IKZF1, IKZF3, ZFP91, ZNF276, ZNF653, ZNF692 (todos ellos ZF doble), o el degrón dedo de zinc híbrido ZFP91/IKZF1 con o sin IKZF1 ZF3 (ZF doble y ZF sencillo, respectivamente). Las secuencias individuales de dedos de zinc C2H2 están subrayadas. Las células T humanas primarias modificadas con el TCR CDK4 y los degrones dedo de zinc Zap70-PD1 indicados se pretrataron con 0.5 μM de pomalidomida, 0.5 μM de talidomida o con el control de DMSO. Los datos muestran la expresión intracelular de IFNγ, IL2, TNFα y LAMP1 en la superficie celular de células T CD8+ CDK4 TCR+, con alto contenido de EGFP en cultivo conjunto con células tumorales NKIRTL006 en presencia o ausencia continuada de pomalidomida o talidomida. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 2).

Referencia a un listado de secuencias

El listado de secuencias, que forma parte de la presente divulgación, incluye un archivo de texto que comprende secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos de la presente invención. El objeto del listado de secuencias se incorpora en este documento en su totalidad. La información registrada en formato legible por ordenador es idéntica al listado de secuencias escrito.

Definiciones

Los encabezamientos de sección utilizados en el presente documento tienen únicamente fines organizativos y no deben interpretarse como una limitación de la materia descrita.

Una parte de esta divulgación contiene material sujeto a protección de derechos de autor (como, por ejemplo, diagramas, fotografías de dispositivos o cualquier otro aspecto de esta presentación para el que exista o pueda existir protección de derechos de autor en cualquier jurisdicción). El titular de los derechos de autor no tiene ninguna objeción a la reproducción facsímil por cualquier persona del documento de patente o de la divulgación de la patente, tal como aparece en el archivo o registros de patentes de la Oficina de Patentes, pero se reserva todos los derechos de autor.

A lo largo de la especificación y las reivindicaciones se utilizan diversos términos relacionados con los métodos, composiciones, usos y otros aspectos de la presente invención. A menos que se indique lo contrario, estos términos tienen el significado habitual en la técnica a la que pertenece la invención. Los demás términos específicamente definidos deberán interpretarse de forma coherente con la definición que figura en el presente documento. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden utilizar en la práctica para las pruebas de la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen en el presente documento.

A efectos de la presente invención, a continuación, se definen los siguientes términos.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos de forma singular "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "y/o" se refiere a una situación en la que uno o más de los casos mencionados pueden ocurrir, solos o en combinación con al menos uno de los casos mencionados, hasta con todos los casos mencionados.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "al menos" un valor particular significa ese valor particular o más. Por ejemplo, "al menos 2" se entiende igual que "2 o más", es decir, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, etc. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "como máximo" de un valor particular significa ese valor particular o menos. Por ejemplo, "como máximo 5" se entiende igual que "5 o menos", es decir, 5, 4, 3, ... -10, -11, etc.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "que comprende" se interpreta como inclusivo y abierto, y no exclusivo. Específicamente, el término y sus variaciones significan que se incluyen las características, etapas o componentes especificados. Estos términos no deben interpretarse en el sentido de que excluyen la presencia de otras características, etapas o componentes. También engloba el más limitativo "que consiste en".

Tal como se utiliza en el presente documento, "técnicas convencionales" o "métodos conocidos por el experto" se refieren a una situación en la que los métodos para llevar a cabo las técnicas convencionales utilizadas en los métodos de la invención serán evidentes para el trabajador experto. La práctica de técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica, cultivo celular, genómica, secuenciación, tratamiento médico, farmacología, inmunología y campos afines es bien conocida por los expertos en la materia, y se trata en diversos manuales y referencias bibliográficas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ejemplar" significa "que sirve como ejemplo, instancia o ilustración", y no debe interpretarse como excluyente de otras configuraciones divulgadas en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los términos "cáncer", "neoplasia" y "tumor" suelen utilizarse indistintamente para describir células que han sufrido una transformación maligna que las hace patológicas para el organismo huésped. Las células cancerosas primarias pueden distinguirse de las no cancerosas mediante técnicas conocidas por el experto. Una célula cancerosa, tal como se utiliza en el presente documento, incluye no sólo células cancerosas primarias, sino también células cancerosas derivadas de dicha célula cancerosa primaria, incluidas células cancerosas que han hecho metástasis, y líneas celulares derivadas de células cancerosas. Por ejemplo, tumores sólidos y no sólidos o tumores sanguíneos. Ejemplos de cánceres incluyen, sin limitación, leucemia, linfoma, sarcomas y carcinomas (por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, melanoma, linfoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de colon, melanoma (maligno), cáncer de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, cáncer de pulmón, carcinoma pulmonar de células no pequeñas y adenocarcinoma de pulmón). Como es bien sabido, los tumores pueden hacer metástasis desde un primer sitio a otro u otros tejidos o localizaciones en el cuerpo. La referencia al tratamiento de una "neoplasia", "tumor" o "cáncer" en un paciente incluye el tratamiento del cáncer primario y, en su caso, el tratamiento de las metástasis.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "gen quimérico" o "ácido nucleico quimérico" se refieren a cualquier gen o ácido nucleico que no se encuentra normalmente en la naturaleza en una especie, en particular un gen o ácido nucleico en el que una o más partes de la secuencia de nucleótidos no están asociadas entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el promotor no está asociado en la naturaleza con una parte o la totalidad de la región transcrita o con otra región reguladora, o diferentes partes de la región transcrita no

están asociadas en la naturaleza. Se entiende que el término "gen quimérico" incluye construcciones de expresión en las que un promotor o una secuencia reguladora de la transcripción está operablemente unida a una o más secuencias codificantes. Un gen quimérico de ácido nucleico quimérico puede, en algunas realizaciones, utilizarse para fabricar una proteína quimérica.

5 Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "proteína" y "polipéptido" se refieren a moléculas formadas por una cadena de aminoácidos, sin referencia a un modo de acción, tamaño, estructura tridimensional u origen específicos. De este modo, un "fragmento", o "porción" o "parte" de un polipéptido puede seguir denominándose "polipéptido". Una "proteína aislada" o polipéptido aislado se utiliza para referirse a una proteína o polipéptido que ya no se encuentra en su entorno natural, por ejemplo, *in vitro* o en una célula huésped recombinante.

10 Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "polipéptido quimérico", "proteína quimérica" o "proteína de fusión" se refieren a cualquier polipéptido que no se encuentra normalmente en la naturaleza que es una especie, en particular un polipéptido en el que una o más partes de la secuencia de aminoácidos no están asociadas entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el polipéptido quimérico puede comprender una parte del terminal N consistente en una primera secuencia de aminoácidos y una parte del terminal C consistente en una segunda secuencia de aminoácidos que no se asocian entre sí en la naturaleza y/o no se asocian entre sí en la naturaleza en este orden. Un polipéptido quimérico puede obtenerse, por ejemplo, a partir de la transcripción y traducción de un gen quimérico de ácido nucleico.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a cualquier polímero u oligómero de nucleótidos (contiguos). El ácido nucleico puede ser ADN o ARN, o una mezcla de ambos, y puede existir de forma permanente o transitoria en forma monocatenaria o bicatenaria, incluidos los estados homodúplex, heterodúplex e híbrido. La presente invención contempla cualquier componente de ácido nucleico desoxirribonucleótido, ribonucleótido o péptido, y cualquier variante química de los mismos, como las formas metiladas, hidroximetiladas o glicosiladas de estas bases, y similares. Los polímeros u oligómeros pueden tener una composición heterogénea u homogénea, y pueden aislarse de fuentes naturales o producirse artificial o sintéticamente. El término "aislado" significa, por lo tanto, aislado de fuentes naturales o producido artificial o sintéticamente.

20 Como se usa en el presente documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de material formulado junto con uno o más portadores (aditivos) y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

25 Como se usa en el presente documento, "terapia" o "tratamiento" se refiere al tratamiento de un tumor con un agente terapéutico (incluyendo materiales biológicos y células) o fármaco. Un tratamiento puede implicar la administración de más de un fármaco. Un fármaco puede administrarse solo o en combinación con otros tratamientos, ya sea de forma simultánea o secuencial, dependiendo de la afección a tratar. Por ejemplo, la terapia puede ser una terapia conjunta que implique la administración de dos fármacos/agentes, uno o más de los cuales pueden estar destinados a tratar el tumor. El régimen de tratamiento puede consistir en un calendario, plan, esquema o programa predeterminado de administración de la terapia, que puede ser preparado por un médico o facultativo y puede adaptarse al paciente que requiera tratamiento. El régimen de tratamiento puede indicar uno o más de los siguientes aspectos: el tipo de terapia que se administrará al paciente; la dosis de cada fármaco; el intervalo de tiempo entre administraciones; la duración de cada tratamiento; el número y la naturaleza de los descansos del tratamiento, si los hay, etc. En el caso de una terapia conjunta, puede proporcionarse un único régimen de tratamiento que indique cómo debe administrarse cada fármaco/agente.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "paciente" o "individuo" o "sujeto" se refiere a un mamífero. Los mamíferos incluyen, entre otros, los animales domésticos (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), los primates (por ejemplo, primates humanos y no humanos como los monos), los conejos y los roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En ciertas realizaciones, el paciente, individuo o sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, el paciente puede ser un "paciente con cáncer", es decir, uno que sufre o corre el riesgo de sufrir uno o más síntomas de cáncer.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que está unida. El término incluye el vector como estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que están operativamente unidos. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión"

Descripción detallada

40 55 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Se contempla que cualquier método, uso o composición descritos en el presente documento pueden implementarse con respecto a cualquier otro método, uso o composición descritos en el presente documento. Las realizaciones comentadas en el contexto de los métodos, usos y/o composiciones de la invención pueden emplearse con respecto a cualquier otro método, uso o

composición descritos en el presente documento. De este modo, una realización perteneciente a un método, uso o composición puede aplicarse también a otros métodos, usos y composiciones de la invención.

5 Tal como se plasma y describe ampliamente en el presente documento, la presente invención se dirige al sorprendente descubrimiento de que con un polipéptido quimérico tal como se divulga en el presente documento ahora es posible controlar la actividad de las células T, en particular controlar la actividad citotóxica de las células T y/o controlar la secreción de citocinas por dichas células T, por ejemplo células T positivas para CD4 o CD8, y controlar la actividad de las células asesinas naturales, en particular controlar la actividad citotóxica de las células NK y/o controlar la secreción de citocinas por dichas células NK.

10 Más en particular, los presentes inventores han desarrollado un sistema innovador para modular y/o manipular vías de transducción de señales en células T y células NK. El sistema permite la regulación dependiente del tiempo y/o de la dosis de la actividad de las células T como consecuencia de la señalización mediante el receptor de células T (TCR) y/o el receptor de antígeno quimérico (CAR) y la regulación dependiente del tiempo y/o de la dosis de la actividad de las células NK como consecuencia de la señalización mediante el receptor de células NK (NKR) y/o el receptor de antígeno quimérico (CAR). El sistema puede utilizarse adecuadamente para cualquier célula que exprese un TCR y/o un CAR, incluyendo células T naturales o células T manipuladas para expresar un TCR y/o CAR particular (modificado) y/o cualquier célula que exprese un NKR y/o un CAR, incluyendo células NK naturales o manipuladas. Por lo tanto, de acuerdo con realizaciones de la invención, la célula de acuerdo con la invención es un linfocito, en particular una célula T o una célula NK. Tales células T y/o células NK incluyen cualquier célula T o NK "modificada", por ejemplo, células T CAR, células NK CAR, células T CAR múltiples, células NK CAR múltiples, células T CAR en tándem, células NK CAR en tándem, células T TCR transgénicas y células NK TCR transgénicas.

15 La presente divulgación proporciona una regulación estricta de la actividad de células T y células NK (por ejemplo, actividad citotóxica y/o secreción de citocinas) por el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención debido a la presencia de un dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas que se utiliza para modular (por ejemplo, reducir o aumentar) de manera dependiente del tiempo y/o la dosis la expresión del polipéptido quimérico de acuerdo con la invención.

20 El polipéptido quimérico está diseñado para interactuar con motivos de activación basados en tirosina inmunorreceptora fosforilada (ITAM) en el complejo TCR/CD3 y/o CAR y/o complejos de receptores de células NK (NKR) que contienen moléculas de señalización portadoras de ITAM como DAP12, la cadena gamma (γ) del receptor de inmunoglobulina Fc ϵ RI o la cadena zeta de CD3 (Lanier et al., Nat Immunol. 2008 May; 9(5): 495-502).

25 Los residuos de tirosina dentro de estos motivos ITAM se fosforilan tras la interacción de las moléculas receptoras con sus ligandos y forman sitios de acoplamiento para otras proteínas implicadas en las vías de señalización de la célula. Mediante la interacción del polipéptido quimérico de acuerdo con la invención con el TCR y/o CAR, se inhibe la activación de las células T (y los subsiguientes efectos citotóxicos y/o secreción de citocinas). Del mismo modo, mediante la interacción del polipéptido quimérico de acuerdo con la invención con el NKR y/o CAR en las células NK, se inhibe la activación de células NK (y los subsiguientes efectos citotóxicos y/o secreción de citocinas) de las células NK.

30 De acuerdo con una realización preferida, el polipéptido quimérico comprende, junto a un dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas y un dominio que interactúa con los motivos ITAM fosforilados, también un motivo conmutador basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM), preferiblemente un ITSM y un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM). Tales motivos están, por ejemplo, presentes en la cola inhibidora de PD1 y se ha sugerido que están implicados en sus efectos inmunosupresores de PD1 (Boussiotis et al., Cancer J. 2014 Jul-Aug; 20(4): 265-271). Se descubrió sorprendentemente que la presencia de dicho ITSM, preferiblemente dicho ITSM y dicho ITIM, en el polipéptido quimérico, permite que el polipéptido quimérico inhiba eficazmente la transducción de señales por, por ejemplo, el TCR, el NKR o el CAR (tras la unión del ligando al receptor). En el presente documento se muestra que se puede hacer uso de estos ITSM, preferiblemente ITSM e ITIM como están presentes en, por ejemplo, las colas inhibidoras de la proteína del receptor inmune inhibidor como PD1, para inhibir la señalización de TCR y/o CAR en células T y la señalización de NKR en células NK sin necesidad de que el dominio extracelular de las proteínas inhibidoras esté presente o de que haya interacción con sus ligandos (por ejemplo, PD-L1 para PD1). En combinación con el dominio de estabilidad de la proteína regulada por moléculas pequeñas que permite la expresión dependiente de la dosis del polipéptido quimérico en una célula, por ejemplo, una célula T, el sistema proporciona así una manera eficiente y fiable de regular con precisión la función de la célula T, por ejemplo, la activación de la célula T, la citotoxicidad de la célula T y/o la secreción de citocinas de la célula T. De este modo, la función de las células T puede prevenirse/inhibirse o activarse, lo que conduce a una funcionalidad mantenida, recuperada, segura y controlable de las células T, tanto *in vitro* como *in vivo* (es decir, en tratamientos del cáncer u otras afecciones como las enfermedades autoinmunes que dependen del uso de células T, incluidas las células T que expresan un TCR y/o CAR (modificado))./pct

Del mismo modo, la función de las células NK puede prevenirse/inhibirse o activarse, lo que conduce a una funcionalidad mantenida, recuperada, segura y controlable de las células NK, tanto *in vitro* como *in vivo* (es decir, en tratamientos de cáncer u otras afecciones como enfermedades autoinmunes que dependen del uso de células NK, incluidas las células NK que expresan un NKR y/o CAR (modificado)).

5 Por lo tanto, como se describe en el presente documento, se proporciona una célula que comprende un polipéptido quimérico, o un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica dicho polipéptido quimérico, en el que el polipéptido quimérico comprende:

- a) una primera parte que comprende un dominio SH2 de una proteína que se une a un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAM) fosforilada; y
- 10 b) una segunda parte que comprende un dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas.

La célula de acuerdo con la invención puede ser cualquier célula que pueda comprender adecuadamente un polipéptido quimérico según se divulga en el presente documento o ácido nucleico que codifique dicho polipéptido quimérico. En algunas realizaciones, la célula es una célula procariota. En algunas realizaciones, la célula es una célula eucariota. Preferiblemente la célula es una célula eucariota, incluso más preferiblemente una célula de mamífero, tal como una célula humana. La célula puede ser una célula especializada, tal como una célula T o células NK, o ser cualquier otro tipo de célula, incluidas las células madre (indiferenciadas).

El polipéptido de acuerdo con la invención es un polipéptido quimérico que comprende al menos una primera parte y una segunda parte. El orden en el que la primera y la segunda parte están presentes en el péptido quimérico no es crítico. La invención no está limitada por la ubicación de la primera parte, segunda parte o tercera parte en el polipéptido quimérico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la primera parte o la segunda parte está fusionada (p. ej., unida genéticamente) en el terminal N o en el terminal C del polipéptido quimérico, o presente internamente en el polipéptido quimérico. En otras palabras, en el polipéptido quimérico, la primera parte y/o la segunda parte pueden estar en el terminal C, en el terminal N, o pueden estar flanqueadas en el terminal C y/o en el terminal N por partes adicionales. La primera parte puede, en relación con la segunda parte, estar más hacia el terminal C, o puede, en relación con la segunda parte, estar más hacia el terminal N.

La primera y la segunda parte pueden ser directamente adyacentes entre sí o pueden estar separadas entre sí por partes adicionales, es decir, (tramos de) residuos de aminoácidos adicionales.

El polipéptido quimérico como se divulga en el presente documento se caracteriza por la presencia de una primera parte que comprende un dominio SH2 de una proteína que se une a un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada (ITAM). Como puede observarse en los Ejemplos, el dominio SH2 puede ser cualquier dominio SH2 de una proteína que pueda unirse a un ITAM fosforilado. La persona experta conoce bien el dominio SH2 adecuado para su uso en el polipéptido quimérico según se divulga en el presente documento y/o es fácilmente capaz de identificar dicho dominio SH2 adecuado o proteínas que comprenderían dicho dominio SH2 capaz de unirse a un (ITAM) fosforilado. Como comprenderá el experto, puede seleccionar un dominio SH2 adecuado en vista del ITAM que comprende, por ejemplo, el complejo TCR/CD3 y/o los complejos CAR y/o el receptor de células NK (NKR) para los que está diseñado el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención. En otras palabras, la proteína quimérica de acuerdo con la invención comprende un dominio SH2 de una proteína que se une a un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada (ITAM), y en el que dicho ITAM está comprendido en, por ejemplo, el complejo TCR o CAR al que se va a dirigir en el contexto de la presente invención.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dominio SH2" se refiere a un dominio de homología SRC 2. El dominio SH2 es un dominio proteico estructuralmente conservado que se encuentra en la oncoproteína Src y en muchas otras proteínas transductoras de señales intracelulares. Los dominios SH2 permiten a las proteínas que los contienen acoplarse a los residuos de tirosina fosforilados de otras proteínas. De este modo, los dominios SH2 son dominios proteicos modulares que actúan como adaptadores y median en las interacciones proteína-proteína uniéndose a péptidos fosforilados en sus respectivos compañeros de unión a proteínas.

Los dominios SH2 se unen típicamente a un residuo de tirosina fosforilado en el contexto de un motivo peptídico más largo dentro de una proteína diana. Los dominios SH2 como tales carecen de actividad catalítica intrínseca, pero sirven para localizar dominios funcionales acoplados en el polipéptido en las proximidades de sustratos, activadores o inhibidores apropiados (Ngoenkam et al., Immunology, 2018 Jan; 153(1): 42-50).

Algunos dominios SH2 pueden, por ejemplo, interactuar con una proteína que tenga un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada (ITAM), mientras que otros dominios SH2 interactúan con una proteína que tenga un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada (ITIM). En la presente invención se utiliza un dominio SH2 de una proteína que se une a un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada (ITAM). Se descubrió sorprendentemente que, mientras que los dominios SH2 de proteínas que se unen a un ITAM fosforilado son importantes para la regulación de la actividad de células T o de células NK mediante el péptido quimérico según se divulga en el presente documento, los

dominios SH2 que interactúan con ITIM no son adecuados para su uso en el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención o lo son en menor medida.

En una realización preferida, el dominio SH2 es de una proteína que se une a un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada (ITAM) que está presente en un complejo TCR, un complejo NKR y/o un CAR.

En algunas realizaciones, el dominio SH2 es un dominio SH2 anotado como BetaA-AlfaA-BetaB-BetaC-BetaD-BetaE-BetaF-AlfaB-BetaG por Liu et al., (Mol Cell. 2006; 22(6):851-868. doi: 10.1016/j.molcel.2006.06.001) para 120 dominios SH2 humanos conocidos; con Beta refiriéndose a una cadena beta y alfa refiriéndose a una hélice alfa (véase también Eck et al., Nature. 1993; 362(6415):87-91. doi: 10.1038/362087a0). Los dominios SH2 pueden encontrarse, por ejemplo, en diversas bases de datos bien conocidas por el experto (véase, por ejemplo, smart.embl.de/smart/do_annotation.pl?DOMAIN=SM00252 o www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR000980/).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAM)" se refiere a una secuencia conservada de cuatro aminoácidos que se repite dos veces y está presente en las colas citoplasmáticas (es decir, endodominios) de ciertas proteínas de superficie celular del sistema inmunitario. Un medio ITAM comprende un residuo de tirosina (Y) separado de un residuo de leucina (L) o residuo de isoleucina (I) por otros dos aminoácidos cualesquiera. La secuencia consenso del medio ITAM es YxxL/I. Los dos medios ITAM están normalmente separados entre sí por 6 u 8 aminoácidos para formar un ITAM completo. La secuencia consenso de ITAM es YxxL/Ix(6-8)YxxL/I. Los ITAM desempeñan un papel importante en la transducción de señales en las células inmunitarias y se encuentran en las colas citoplasmáticas de las moléculas de señalización celular del complejo receptor de células T (cadena épsilon de CD3, cadena delta de CD3, cadena gamma de CD3 y/o cadena zeta de CD3). En las células NK, los ITAM están presentes en complejos de receptores de células NK que contienen la cadena zeta de CD3, la cadena gamma (γ) del receptor de inmunoglobulina Fc ϵ RI y DAP12 (Lanier et al., Nat Immunol. 2008 May; 9(5): 495-502). Los ITAM también están presentes en complejos de receptores de antígenos quiméricos (CAR) que comprenden la cadena zeta de CD3 (Abate-Daga et al., Mol Ther Oncolytics. 2016; 3: 16014), la cadena épsilon de CD3 (Nolan et al., Clin Cancer Res. 1999 Dec; 5(12):3928-41), cadena gamma (γ) del receptor de inmunoglobulina Fc ϵ RI (Ren-Heidenreich et al., Cancer Immunol Immunother. 2002 Oct; 51(8):417-23) y DAP12 (Töpfer et al., J Immunol. 2015 Apr 1; 194(7):3201-12).

Los residuos de tirosina en los motivos ITAM se fosforilan tras la interacción de las moléculas receptoras con sus ligandos y forman sitios de acoplamiento para otras proteínas implicadas en las vías de señalización de la célula. Una vez fosforilada, las proteínas que comprenden el dominio SH2 que se unen a dicho ITAM fosforilado pueden interactuar con el ITAM fosforilado, por ejemplo, presente en la cadena zeta de CD3. Se sabe que varias proteínas contienen endodominios con uno o más motivos ITAM. Ejemplos de tales proteínas incluyen la cadena gamma de CD3, la cadena delta de CD3 y la cadena épsilon de CD3, la cadena zeta de CD3, la cadena gamma (γ) del receptor de inmunoglobulina Fc ϵ RI y DAP12.

El polipéptido quimérico divulgado en el presente documento se caracteriza además por la presencia de una segunda parte que comprende un dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas. El dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas también puede denominarse dominio de desestabilización regulable. Este dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas o dominio de desestabilización regulable en el polipéptido quimérico de la invención se utiliza para modular (por ejemplo, reducir o aumentar) de manera dependiente del tiempo y/o de la dosis la expresión del polipéptido quimérico de la invención.

En más detalle, el dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas o dominio de desestabilización regulable en el polipéptido quimérico de la invención es un dominio que puede regularse mediante el suministro de un compuesto (por ejemplo, molécula pequeña) a la célula que comprende el polipéptido quimérico. Mediante la adición del compuesto, el dominio de estabilidad de la proteína regulado por la molécula pequeña o el dominio de desestabilización regulable en el polipéptido quimérico se modifica para provocar la ruptura del polipéptido quimérico.

En otras palabras, en respuesta a dicho compuesto, y a través de interacciones del compuesto con el dominio de estabilidad de la proteína regulado por moléculas pequeñas o el dominio de desestabilización regulable en el polipéptido quimérico, el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención se degradará, lo que conducirá a una disminución del nivel o concentración del polipéptido quimérico en la célula. A su vez, al reducir el nivel o la concentración del polipéptido quimérico en la célula, se invierte la inhibición de la función de la célula T, por ejemplo, la activación de la célula T, la toxicidad de la célula T y/o la secreción de citocinas por la célula T como consecuencia de la señalización a través del TCR y/o CAR.

Del mismo modo, en las células NK al reducir el nivel o la concentración del polipéptido quimérico en la célula, se invierte la inhibición de la función de la célula NK, por ejemplo, la activación de la célula NK, la toxicidad de la célula NK y/o la secreción de citocinas por la célula NK como consecuencia de la señalización a través del

NKR y/o CAR. De este modo, la función de las células T y/o de las células NK puede modularse mediante el polipéptido quimérico de la invención. De este modo, la función de las células T y/o la función de las células NK puede modularse proporcionando a la célula un compuesto que interactúe con el dominio de estabilidad de la proteína regulado por moléculas pequeñas o el dominio de desestabilización regulable en el polipéptido quimérico, provocando la ruptura del polipéptido quimérico de la invención.

Se descubrió sorprendentemente que con el polipéptido quimérico de la invención la función de células T o la función de células NK puede, a través del dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas o el dominio de desestabilización regulable en el polipéptido quimérico, modularse de forma reversible y/o de forma dependiente de la dosis (véanse los Ejemplos). En ausencia de un compuesto que interactúe con el dominio de estabilidad de la proteína regulado por moléculas pequeñas o con el dominio de desestabilización regulable, cuya interacción provoque la ruptura del polipéptido quimérico, el polipéptido quimérico de la invención inhibe la función de las células T mediante la inhibición de la señalización a través del TCR y/o CAR como consecuencia de la interacción del polipéptido quimérico con el complejo TCR/CD3 y/o CAR.

Del mismo modo, en ausencia de un compuesto que interactúe con el dominio de estabilidad de la proteína regulado por moléculas pequeñas o con el dominio de desestabilización regulable, y que en ese caso provoque la ruptura del polipéptido quimérico, el polipéptido quimérico de la invención inhibe la función de las células NK mediante la inhibición de la señalización a través del NKR y/o CAR como consecuencia de la interacción del polipéptido quimérico con los complejos NKR que contienen moléculas de señalización portadoras de ITAM tales como la cadena zeta de CD3, la cadena gamma (γ) del receptor de inmunoglobulina Fc ϵ RI y DAP12 y/o CAR. En presencia de dicho compuesto, el polipéptido quimérico se dirigirá hacia los sistemas de degradación de proteínas en la célula, y con ello liberará la inhibición de la función de las células T y/o la función de las células NK; dicha liberación de la inhibición de la función de las células T y/o la función de las células NK depende de la dosis, como puede observarse en los Ejemplos.

Alternativamente, se puede utilizar un dominio de estabilidad de la proteína regulado por moléculas pequeñas o un dominio de desestabilización regulable que dirija la degradación de la proteína quimérica de la invención en ausencia de la molécula pequeña. En tales realizaciones, la presencia de la molécula pequeña provoca la estabilización de la proteína quimérica y, por lo tanto, la inhibición de la función de las células T o células NK, y la retirada del pequeño compuesto restauraría la actividad de las células T o células NK.

La invención no se limita a ningún dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas o dominio de desestabilización regulable en particular. De hecho, cualquier dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas o dominio de desestabilización regulable que confiera estabilidad al polipéptido quimérico (Röth et al., Cell Mol Life Sci. 2019 Jul; 76(14):2761-2777) tal que la degradación del polipéptido quimérico se produce cuando el dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas o el dominio de desestabilización regulable en el polipéptido quimérico se modifica para dirigir el polipéptido quimérico a la degradación por la presencia de su molécula pequeña afin puede usarse en la invención. El experto conoce bien estos dominios de estabilidad de proteínas regulados por moléculas pequeñas o dominios de desestabilización regulables. Un ejemplo no limitativo de dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas o dominio de desestabilización regulable es un degrón autoextirpante (SED), en el que el SED comprende una proteasa reprimible, un sitio de escisión afin y una secuencia de degrón (Chung et al., Nat Chem Biol. 2015 Sep; 11(9):713-20) o un dominio de unión a quimeras dirigidas a la proteólisis (Protac). Las Protac que a su vez puede unirse al dominio de unión a Protac en el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención comprende un grupo de unión a ubiquitina ligasa E3 (E3LB), un enlazador y un grupo de unión a proteína que se une al dominio de unión a Protac en el polipéptido quimérico (Nabet et al., Nat Chem Biol. 2018 May; 14(5):431-441, An et al., EBioMedicine. 2018 Oct; 36: 553-562). Un ejemplo preferido de dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas o dominio de desestabilización regulable para su uso en la presente invención se denomina en términos generales dominio de sustrato de polipéptido CRBN capaz de unirse a la proteína CRBN en respuesta a un fármaco, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico. Entre los ejemplos típicos de este tipo de dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas se encuentran los denominados degrones dedo de zinc.

Los IMiD de molécula pequeña como talidomida, lenalidomida, y pomalidomida inducen *in vivo* la ubiquitinación y degradación proteasomal de factores de transcripción como Ikaros (IKZF1) y Aiolos (IKZF3) mediante el reclutamiento de estas proteínas con dominio de dedo de zinc Cys2-His2 (C2H2) a Cereblon (CRBN), el receptor del sustrato de la ubiquitina ligasa E3 CRL4CRBN. Dichos dominios de dedos de zinc (degrones dedo de zinc) pueden utilizarse para dirigir proteínas heterólogas para su degradación de una manera dependiente del tiempo y la dosis, tanto *ex vivo* como *in vivo* al proporcionar un IMiD a células que expresan dicho dominio de dedos de zinc que comprende proteína heteróloga (véase Koduri et al., PNAS (2019) 116 (7) 2539-2544; doi.org/10.1073/pnas.1818109116).

De hecho, se ha implementado un gran número de posibles polipéptidos dedos de zinc y dominios de dedos de zinc en la mediación de la degradación de proteínas diana mediada por moléculas pequeñas, por ejemplo, IMiD (como talidomida, lenalidomida y pomalidomida) (véase, por ejemplo, Sievers et al., Science. 2018 Nov 2;

362(6414): eaat0572.doi: 10.1126/science.aat0572). En vista de ello, el experto conoce bien el uso y diseño de tales dominios de sustrato de polipéptido CRBN capaces de unirse a la proteína CRBN en respuesta a un fármaco, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, en particular cuando el dominio de sustrato de polipéptido CRBN es una proteína de dedo de zinc C2H2 o un fragmento de la misma que es capaz de unirse de forma inducible por el fármaco al polipéptido CRBN, y como se detalla en el presente documento.

De acuerdo con la invención, se proporciona una célula de la invención en la que el polipéptido quimérico comprende una tercera parte que comprende un motivo conmutador basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM), un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM), o preferiblemente un ITSM y un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM). En algunas realizaciones alternativas, la tercera parte comprende un motivo conmutador basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM) y/o un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM), preferiblemente un ITSM y un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM).

Preferiblemente, la tercera parte comprende un motivo conmutador basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM), preferiblemente un ITSM y un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM).

El orden en que la primera, segunda y tercera parte están presentes en el péptido quimérico no es crítico. En general, la invención no está limitada por la ubicación de la primera parte, la segunda parte o la tercera parte en el polipéptido quimérico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la primera parte, la segunda parte o la tercera parte está fusionada (p. ej., unida genéticamente) al terminal N o al terminal C del polipéptido quimérico, o presente internamente en el polipéptido quimérico. En otras palabras, en el polipéptido quimérico, la primera, segunda o tercera parte puede estar en el terminal C, en el terminal N, o puede estar flanqueada en el terminal C y/o en el terminal N por otras partes. Ejemplos de orden adecuado de la primera parte (P1), segunda parte (P2) y tercera parte (P3) pueden ser en general xP1xP2xP3x, xP1xP3xP2x, xP2xP1xP3x, xP2xP3xP1x, xP3xP1xP2x o xP3xP2xP1x, donde x en cualquier posición puede referirse, independientemente, a la presencia de ningún residuo de aminoácido adicional o a la presencia de uno o más residuos de aminoácido adicionales que no forman parte de P1, P2 y/o P3. Con respecto al orden de la primera y segunda parte, y por analogía con el ejemplo anterior, ejemplos de orden adecuado de la primera parte (P1) y la segunda parte (P2) pueden ser en general xP1xP2x, o xP2xP1x, donde x en cualquier posición puede referirse, independientemente a la presencia de ningún residuo de aminoácido adicional o a la presencia de uno o más residuos de aminoácido adicionales que no forman parte de P1 y/o P2.

Al mismo tiempo, el experto entenderá que la primera parte puede, además del dominio SH2 de una proteína que se une a un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada (ITAM), comprender otros dominios o aminoácidos, por ejemplo, uno o varios de los aminoácidos que normalmente flanquean (en uno o en ambos lados) el dominio SH2 en una proteína que se une a un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada (ITAM).

Al mismo tiempo, el experto entenderá que la segunda parte puede, además del dominio de estabilidad de la proteína regulado por moléculas pequeñas, comprender otros dominios o aminoácidos en uno o en ambos lados.

Al mismo tiempo, el experto entenderá que la tercera parte puede, además del motivo conmutador basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM), preferiblemente un ITSM y un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM), comprender otros dominios o aminoácidos, por ejemplo, uno o varios de los aminoácidos que normalmente flanquean estos motivos (en uno o en ambos lados).

El experto entenderá que la primera, segunda y tercera parte del polipéptido quimérico de la invención pueden estar presentes en el polipéptido quimérico en cualquier orden siempre que el dominio de estabilidad de proteína regulado por moléculas pequeñas o el dominio de desestabilización regulable se coloquen en el polipéptido quimérico de tal manera que al entrar en contacto con el compuesto que interactúa con el dominio de estabilidad de proteína regulado por moléculas pequeñas o el dominio de desestabilización regulable, el polipéptido quimérico se degrada y la inhibición de la función de células T y/o de células NK a través de la interacción del polipéptido quimérico con el TCR y/o CAR se libera debido a la descomposición del polipéptido quimérico.

Los términos "ITIM" y/o "ITSM" son conocidos por el experto (Liu et al., Mol Cell Proteomics. 2015 Jul; 14(7): 1846-58).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM)" se refiere en general a una secuencia conservada de aminoácidos que se encuentra en las colas citoplasmáticas de muchos receptores inhibidores del sistema inmunitario. El motivo ITIM comprende un residuo de serina (S), un residuo de isoleucina (I), un residuo de valina (V) o un residuo de leucina (L), separado por cualquier otro residuo de aminoácido (x) de un residuo de tirosina (Y), separado por cualesquiera otros dos aminoácidos de un residuo de isoleucina (I), un residuo de valina (V) o un residuo de leucina (L). La firma de

consenso es S/I/V/LxYxxI/V/L. *In vivo*, los receptores inhibidores que poseen ITIM interactúan con su ligando, haciendo que el motivo ITIM sea fosforilado por enzimas de las quinasas Src, lo que les permite reclutar SH2 que contienen proteínas tirosina fosfatasa (PTP) tales como SHP-1 y SHP-2 (Coxon et al., Blood. 2017 Jun 29; 129(26):3407-3418), y fosfatasa lipídica como SHIP-1. Las PTP se oponen al efecto regulador positivo de las proteínas tirosina quinasas (PTK) como Lck y Zap70, regulando así negativamente la señalización de las células T (Lorenz et al., Immunol Rev. 2009 Mar; 228(1): 342-359). Al desfosforilar los ITAM en los TCR, CAR y otros receptores inmunitarios, las PTP pueden invertir los efectos activadores de la fosforilación de los ITAM. Las fosfatasa lipídica regulan la señalización celular modificando las concentraciones de fosfatos lipídicos frente a sus productos desfosforilados.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "motivo de cambio basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM)" se refiere a una secuencia conservada de aminoácidos que se encuentra en las colas citoplasmáticas (o dominios citoplasmáticos o dominio intracelular o endodominio; en otras palabras, la parte de la proteína que está presente en el citoplasma de la célula (y no en la membrana y/o espacio extracelular) de muchos receptores inhibidores del sistema inmunitario. El motivo ITSM comprende un residuo de treonina (T), separado por cualquier otro residuo de aminoácido de un residuo de tirosina (Y), separado por cualquier otros dos aminoácidos de un residuo de valina (V) o de un residuo de isoleucina (I). La firma de consenso es TxYxxV/I. De forma similar a los receptores inhibidores que poseen ITIM, los receptores inhibidores que poseen ITSM interactúan con su ligando, haciendo que el motivo ITIM sea fosforilado por enzimas de las quinasas Src, lo que les permite reclutar fosfatos que contienen SH2, tales como SHP-1 y SHP-2 (Lorenz et al., Immunol Rev. 2009 Mar; 228(1): 342-359). Algunos estudios informaron de que tanto los motivos ITIM como ITSM contribuían a la señalización inhibitoria de PD1 (Boussiotis et al., Cancer J. 2014 Jul-Aug; 20(4): 265-271, Peled et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2018 Jan 16; 115(3):E468-E477). Mientras que, en otros estudios, se demostró que el motivo ITSM era el principal responsable del efecto inhibitorio de PD1, mientras que el motivo ITIM sólo tenía un efecto limitado (Chemnitz et al., J Immunol. 2004 Jul 15; 173(2):945-54, Yokosuka et al., J Exp Med. 2012 Jun 4; 209(6):1201-17).

De acuerdo con la invención, el ITSM y el ITIM pueden derivarse u obtenerse a partir de la misma proteína (por ejemplo, PD1) o pueden obtenerse a partir de dos proteínas diferentes (por ejemplo, el ITIM a partir de PD1 y el ITSM a partir de LY9). Preferiblemente, el ITSM y el ITIM se derivan u obtienen de la misma proteína. Preferentemente, el ITSM y el ITIM están separados entre sí por 15-25 aminoácidos en la tercera parte del polipéptido quimérico de acuerdo con el péptido de la invención. En algunas realizaciones, los aminoácidos que separan el ITSM y el ITIM son los mismos aminoácidos que los de la proteína de la que se derivaron u obtuvieron el ITSM y el ITIM.

Preferiblemente, en el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención, la primera parte, que comprende un dominio SH2 de una proteína que se une a un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada, consta de al menos 80 aminoácidos adyacentes, y/o como máximo 800 aminoácidos adyacentes, preferiblemente de al menos 100 aminoácidos adyacentes, y/o como máximo 400 aminoácidos, por ejemplo, entre 150 y 300 aminoácidos.

Preferiblemente, en el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención, la tercera parte, que comprende un motivo conmutador basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM), preferiblemente un ITSM y un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM), consta de al menos 30 aminoácidos adyacentes, y/o como máximo 600 aminoácidos adyacentes, preferiblemente de al menos 80 aminoácidos adyacentes, y/o como máximo 200 aminoácidos, por ejemplo, entre 85 y 190 aminoácidos.

También se proporciona la célula de acuerdo con la invención, en la que el dominio de estabilidad de proteína regulado por moléculas pequeñas se selecciona del grupo que consiste en un degrón autoextirpante (SED), en el que el SED comprende una proteasa reprimible, un sitio de escisión afín y una secuencia de degrón; y un dominio de unión a quimera dirigida a proteólisis (Protac), en el que la Protac comprende un grupo de unión a ubiquitina ligasa E3 (E3LB), un enlazador y un grupo de unión a proteína que se une al dominio de unión a Protac en el polipéptido quimérico, y un dominio de sustrato de polipéptido CRBN capaz de unirse a la proteína CRBN en respuesta a un fármaco, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico. Por ejemplo, el grupo de unión a proteínas de Protac puede ser AP1867 que se une al dominio de unión a Protac en el polipéptido quimérico de la invención, que puede, por ejemplo, ser FKBP12^{F36V} (SEQ ID NO 35, Nabet et al., Nat Chem Biol. 2018 May; 14(5):431-441). Véase Zou et al., Current Protocols (2019) V37: 1: pp 21-30; doi.org/10.1002/cbf.3369, para una revisión reciente sobre la tecnología PROTAC.

Como comprenderá el experto en la materia, el dominio de estabilidad de proteína regulado por moléculas pequeñas (o dominio de desestabilización regulable) puede ser adecuadamente cualquier dominio que confiera estabilidad al polipéptido quimérico de modo que la degradación del polipéptido quimérico se produzca cuando el dominio de estabilidad de proteína regulado por moléculas pequeñas (o dominio de desestabilización regulable) en el polipéptido quimérico se modifica/dirija para dirigir el polipéptido quimérico a la degradación por la presencia de su molécula pequeña afín.

- 5 Preferiblemente, el dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas es un dominio de sustrato de polipéptido CRBN capaz de unirse a la proteína CRBN en respuesta a un fármaco, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente en el que el dominio de sustrato de polipéptido CRBN es una proteína de dedo de zinc C2H2 o un fragmento de la misma que es capaz de unirse de forma inducible por fármaco al polipéptido CRBN.
- Preferiblemente, el dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas es un dominio de unión a quimeras dirigidas a la proteólisis (Protac). El dominio puede unirse al Protac afín.
- 10 Preferiblemente, el dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas es un degrón autoextirpante (SED), en el que el SED comprende una proteasa reprimible, un sitio de escisión afín y una secuencia de degrón. Este tipo de degrón autoextirpante es bien conocido por los expertos (Chung et al., Nat Chem Biol. 2015 Sep; 11(9):713-20).
- 15 El término "degrón autoextirpante" (SED), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido o complejo proteico que comprende una proteasa reprimible, un sitio de escisión afín y una secuencia de degrón (o secuencia de degradación). El degrón autoextirpante forma parte del polinucleótido quimérico de la invención de tal manera que la proteasa es capaz de escindir el polipéptido quimérico de la invención para separar la secuencia de degrón de otras partes del polipéptido quimérico.
- 20 En algunas realizaciones, la escisión del polipéptido quimérico de la invención por la proteasa separa al menos la primera parte del polipéptido quimérico y comprende un dominio SH2 de una proteína que se une a un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada (ITAM) de la secuencia de degrón (que forma parte de la segunda parte en el polipéptido quimérico).
- 25 En algunas realizaciones, la escisión del polipéptido quimérico de la invención por la proteasa separa al menos la primera parte del polipéptido quimérico y que comprende un dominio SH2 de una proteína que se une a un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada (ITAM), y la tercera parte del polipéptido quimérico de la invención y que comprende un motivo conmutador basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM), preferiblemente un ITSM y un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) de la secuencia de degrón (que forma parte de la segunda parte en el polipéptido quimérico).
- La propia proteasa puede o no eliminarse de la parte del polipéptido quimérico que está separada de la secuencia de degrón.
- 30 El término "degrón" como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína o una parte de ella que es importante en la regulación de las tasas de degradación de proteínas. En diversas realizaciones de la presente divulgación pueden utilizarse diversos degrones conocidos en la técnica, incluidos, entre otros, secuencias cortas de aminoácidos, motivos estructurales y aminoácidos expuestos. Pueden utilizarse degrones identificados a partir de diversos organismos.
- 35 El término "secuencia de degrón" o "secuencia de degradación", tal como se utiliza en el presente documento en el contexto del SED, se refiere a una secuencia que promueve la degradación de una proteína unida a través de las vías del proteasoma o autofagia-lisosoma. Se conocen en la técnica muchas secuencias/señales de degradación diferentes (por ejemplo, del sistema ubiquitina-proteasoma), cualquiera de las cuales puede utilizarse como se indica en el presente documento. Para un análisis de las secuencias de degradación y su función en la degradación de proteínas, véase, p. ej., Kanemaki et al., Pflugers Arch. 2013 Mar; 465(3):419-25, Erales et al., Biochim Biophys Acta. 2014 Jan; 1843(1):216-21.
- 40 El término "sitio de escisión afín", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una secuencia específica o motivo de secuencia reconocido y escindido por la proteasa reprimible en el SED. Un sitio de escisión para una proteasa incluye la secuencia específica de aminoácidos o motivo reconocido por la proteasa durante la escisión proteolítica y típicamente incluye los aminoácidos flanqueantes de uno a seis a cada lado del enlace escindible, que se unen al sitio activo de la proteasa y se utilizan para el reconocimiento como sustrato.
- 45 El término "proteasa reprimible", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteasa que puede ser inactivada por la presencia de un agente o compuesto específico, por ejemplo, un compuesto pequeño (por ejemplo, que se une a la proteasa) (Leuw et al., GMS Infect Dis. 2017; 5: Doc08, Lv et al., HIV/AIDS (Auckl). 2015; 7: 95-104). En algunas realizaciones, una proteasa reprimible es activa (escinde un sitio de escisión afín) en ausencia del agente específico y es inactiva (no escinde un sitio de escisión afín) en presencia del agente específico. En algunas realizaciones, el agente específico es un inhibidor de la proteasa. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteasa inhibe específicamente una proteasa reprimible dada de la presente divulgación.
- 55 En una realización, el SED es una tecnología de desactivación asistida por molécula pequeña (SMASh), es decir, una etiqueta de desactivación asistida por molécula pequeña (etiqueta SMASh) (Chung et al., Nat Chem Biol. 2015 Sep; 11(9): 713-20). Incluye una señal de degradación (es decir, secuencia de degrón) y un sitio de

escisión de proteasa que escinde el degrón de otras partes del polipéptido quimérico de la invención. Sin embargo, en presencia de un inhibidor de proteasa, esta escisión puede bloquearse y el degrón induce una rápida degradación del polipéptido quimérico. En algunas realizaciones, el SMASH puede comprender una proteasa NS3/4A derivada del virus de la hepatitis C (inhibida, por ejemplo, por asunaprevir o grazoprevir) y flanqueada por un dominio de degrón que induce la degradación proteasomal. Los inhibidores de la proteasa NS3/4A del HCV incluyen asunaprevir, grazoprevir, glecaprevir, voxilaprevir, paritaprevir, simeprevir, boceprevir y telaprevir (Majumdar et al., *Aliment Pharmacol Ther.* 2016 Jun; 43(12):1276-92, Ahmed et al., *World J Hepatol.* 2018 Oct 27; 10(10): 670-684).

En otra realización, el dominio de estabilidad de proteína regulado por moléculas pequeñas (o dominio de desestabilización regulable) comprende un dominio de unión a quimera dirigidas a la proteólisis (Protac) en el que el Protac comprende un grupo de unión a ubiquitina ligasa E3 (E3LB), un enlazador y un grupo de unión a proteína que se une al dominio de unión a Protac en el polipéptido quimérico.

Una de las principales vías de degradación celular es el sistema ubiquitina-proteasoma. En este sistema, una proteína es marcada para su degradación por el proteasoma mediante la ubiquitinación de la proteína. La ubiquitinación de la proteína se lleva a cabo mediante una E3 ubiquitina ligasa que se une a una proteína y añade moléculas de ubiquitina a la proteína. La ubiquitina ligasa E3 forma parte de una vía que incluye la enzima activadora de ubiquitina E1 y la enzima conjugadora de ubiquitina E2, que ponen la ubiquitina a disposición de la ubiquitina ligasa E3 para que la añada a la proteína.

Para aprovechar esta vía de degradación, se han desarrollado las Protacs. Las Protacs reúnen a una ubiquitina ligasa E3 con una proteína que debe degradarse. Para facilitar la degradación de una proteína por el proteasoma, la Protac comprende un grupo que se une a una ubiquitina ligasa E3 y un grupo que se une a la proteína que se desea degradar (es decir, al dominio de unión a Protac en el polipéptido). Estos grupos suelen estar conectados con un enlazador. Esta construcción molecular puede acercar la ligasa de ubiquitina E3 a la proteína objetivo para que sea ubiquitinada y marcada para su degradación.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "Protac" se refiere a moléculas quimeras dirigidas a la proteólisis que tienen generalmente tres componentes, un grupo de unión a ubiquitina ligasa E3 (E3LB), un enlazador y un grupo de unión a proteína. Los dominios de unión a Protacs y Protac para su uso en el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención son bien conocidos por el experto (An et al., *EBioMedicine.* 2018 Oct; 36: 553-562).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "enlazador" significa una fracción química que comprende una cadena de átomos que une covalentemente un componente de una Protac a otro componente de la Protac. En varias realizaciones, un enlazador tiene típicamente 8 - 20 átomos de longitud (véase también Cyrus et al., *Mol Biosyst.* 2011 Feb; 7(2): 10.1039/c0mb00074d, Nabet et al., *Nat Chem Biol.* 2018 May; 14(5): 431-441). Los enlazadores comerciales pueden ser, por ejemplo, los proporcionados por Medchemexpress (www.medchemexpress.com).

El grupo de unión a proteínas es un grupo que se une a una proteína diana, en este caso al dominio de unión a Protac presente en el polipéptido quimérico. El grupo de unión a proteínas puede ser, por ejemplo, cualquier fracción que se una específicamente a una proteína (se une a una proteína diana) e incluye los siguientes ejemplos no limitativos de fracciones de proteína diana de molécula pequeña: inhibidores de Hsp90, inhibidores de quinasas, inhibidores de MDM2, compuestos dirigidos contra proteínas que contienen bromodominio BET humano, inhibidores de HDAC, inhibidores de lisina metiltransferasa humana, inhibidores de angiogénesis, compuestos inmunosupresores y compuestos dirigidos contra el receptor de aril hidrocarburo (AHR), entre muchos otros (véase los documentos US2014/0356322 y US2016/0045607).

En algunas realizaciones, el grupo de unión a proteínas en la Protac es AP1867 (www.medchemexpress.com/AP1867.html) y el dominio de unión a Protac en el polipéptido quimérico de la invención es FKBP12^{F36V} (Nabet et al., *Nat Chem Biol.* 2018 May; 14(5): 431-441).

En otra realización, el dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas (o dominio de desestabilización regulable) es un dominio de sustrato de polipéptido CRBN capaz de unirse a la proteína CRBN en respuesta a un fármaco, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferentemente, en el que el dominio de sustrato del polipéptido CRBN es una proteína de dedo de zinc C2H2 o un fragmento de la misma capaz de unirse al polipéptido CRBN de forma inducible por fármaco (en lo sucesivo también denominado "degrón de dedo de zinc"). También se proporciona para la célula de acuerdo con la invención que comprende una proteína quimérica de acuerdo con la invención que comprende tal dominio de estabilidad de proteína regulado por moléculas pequeñas. En dicha realización, la segunda parte de la proteína quimérica de acuerdo con la invención comprende un dominio de estabilidad de la proteína regulado por moléculas pequeñas que es capaz de interactuar y unirse con la proteína CRBN en presencia de un fármaco. Por ejemplo, se ha demostrado que varios IMiD, incluidos los descritos en el presente documento, se unen a la proteína CRBN, promoviendo así la interacción entre la proteína CRBN y su diana

(véase también Buhimschi et al. *Biochemistry* 2019, 58, 861-864; DOI: 10.1021/acs.biochem.8b01307 para una revisión reciente de la tecnología), ubiquitinación y posterior degradación de la proteína diana.

CRBN (Cereblon) es una proteína de 442 aminoácidos que forma un complejo E3 ubiquitina ligasa con la proteína de unión al ADN dañado 1 (DDB1), Cullin-4A (CUL4A) y el regulador de cullins 1 (ROC1; Angers et al., *Nature* 443:590-593). Este complejo ubiquitina otras proteínas. Se ha demostrado que la talidomida, la lenalidomida, la pomalidomida, el CC-122 (avandomida), el CC-220 (iberdomida) y el CC-885 se unen al CRBN (véase, por ejemplo, Lopez - Girona et al., *Leucemia* 26: 2326-2335).

En una realización preferida, el dominio del sustrato polipeptídico CRBN es una proteína dedo de zinc C2H2 o un fragmento de la misma que es capaz de unirse al polipéptido CRBN de forma inducible por fármacos. También se proporciona para la célula de acuerdo con la invención que comprende una proteína quimérica de acuerdo con la invención que comprende tal dominio de estabilidad de proteína regulado por moléculas pequeñas. El grupo plegable como Cys2His2 (C2H2) es una clase bien caracterizada de dedos de zinc que es extremadamente común en los factores de transcripción de mamíferos. Estos dominios adoptan un pliegue $\beta\beta\alpha$ simple, formando dos cadenas β cortas conectadas por un giro (nudillo de zinc; giro beta) seguido de una hélice corta y tienen el motivo de secuencia de aminoácidos (Pabo et al., *Annual Review of Biochemistry* (2001). 70: 313- 40)

X2-Cys-X2,4-Cys-X12-His-X3,4,5-His

En otra realización preferida, la proteína quimérica comprende un dominio de sustrato polipéptido CRBN que comprende uno o más dedos de zinc. También se proporciona para la célula de acuerdo con la invención que comprende una proteína quimérica de acuerdo con la invención que comprende tal dominio de estabilidad de proteína regulado por moléculas pequeñas.

Aunque no se limita en particular a un dominio particular de sustrato de polipéptido CRBN, en particular una proteína dedo de zinc C2H2, o un fragmento de la misma (dominio dedo de zinc) que es capaz de unirse a la proteína CRBN en respuesta a un fármaco, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, en una realización preferida, el dominio de sustrato del polipéptido CRBN se selecciona del grupo que consiste en IKZF1, IKZF3, ZFN654, ZNF787, ZNF653, ZFP91, ZNF276, ZNF827, o un fragmento del mismo que es capaz de unirse al polipéptido CRBN de forma inducible por moléculas pequeñas, preferiblemente en el que dicho fragmento se selecciona del grupo que consiste en IKZF1 ZF2-3 (SEQ ID NO: 41), IKZF3 ZF2-3 (SEQ ID NO: 42), ZFP91 ZF4-5 (SEQ ID NO: 43), ZNF276 ZF4-5 (SEQ ID NO: 44), ZNF653 ZF4-5 (SEQ ID NO: 45), y ZNF692 ZF4-5 (SEQ ID NO: 46) (Ver ejemplos). También se proporciona para la célula de acuerdo con la invención que comprende una proteína quimérica de acuerdo con la invención que comprende tal dominio de estabilidad de proteína regulado por moléculas pequeñas.

En otra realización preferida, el dominio de sustrato del polipéptido CRBN comprende un polipéptido de fusión híbrido en el que el polipéptido de fusión híbrido comprende al menos un primer fragmento de una primera proteína de dedo de zinc C2H2 y un segundo fragmento de una segunda proteína de dedo de zinc C2H2, en el que la combinación de dicho primer fragmento y dicho segundo fragmento en el polipéptido de fusión híbrido es capaz de unirse de forma inducible por un fármaco al polipéptido CRBN. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un giro beta (formado por dos cadenas beta cortas) de una primera proteína dedo de zinc C2H2 puede fusionarse a una hélice alfa de una segunda proteína dedo de zinc C2H2. También se proporciona para la célula de acuerdo con la invención que comprende una proteína quimérica de acuerdo con la invención que comprende tal dominio de estabilidad de proteína regulado por moléculas pequeñas.

Aunque la invención no se limita en particular a polipéptidos de fusión híbridos específicos que puedan formar o puedan estar comprendidos en el dominio de sustrato del polipéptido CRBN, en una realización preferida, el polipéptido de fusión híbrido comprende un primer fragmento seleccionado del giro beta de ZFP91 ZF4 (LQCEICGFTCR; la SEQ ID NO: 52), ZFN653 ZF4 (LQCEICGYQCR; la SEQ ID NO 53), ZNF276 ZF4 (LQCEVCGFQCR; la SEQ ID NO: 54), ZNF827 ZF1 (FQCPICGLVIK; la SEQ ID NO: 55) y un segundo fragmento seleccionado de la hélice alfa de IKZF1 ZF2 (QKGNLLRHIKLIH; la SEQ ID NO: 56), y en cualquier combinación posible. Preferiblemente, el polipéptido de fusión híbrido comprende el giro beta de ZFP91 ZF4 y la hélice alfa de IKZF1 ZF2, preferiblemente en el que el polipéptido de fusión híbrido comprende uno seleccionado de las la SEQ ID NO 47 - 51. También se proporciona para la célula de acuerdo con la invención que comprende una proteína quimérica de acuerdo con la invención que comprende tal dominio de estabilidad de proteína regulado por moléculas pequeñas.

De acuerdo con otra realización, el dominio de unión a sustrato del polipéptido CRBN utilizado en el método de la invención comprende o comprende además IKZF1 ZF3 (FKCHLCNYACRRRDALTGHLRTH; la SEQ ID NO: 57), preferentemente en el que el dominio de unión a sustrato del polipéptido CRBN comprende el giro beta de ZFP91 ZF4, la hélice alfa de IKZF1 ZF2, e IKZF1 ZF3. Preferentemente el IKZF1 ZF3 está en el terminal C de la segunda parte de la proteína quimérica de acuerdo con la invención. También se proporciona para la célula de acuerdo con la invención que comprende una proteína quimérica de acuerdo con la invención que comprende tal dominio de estabilidad de proteína regulado por moléculas pequeñas.

Como comprenderá el experto, en algunas realizaciones, la proteína quimérica de la invención comprende uno o más dominio(s) de sustrato polipeptídico CRBN capaz de unir CRBN en respuesta al fármaco, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina de la proteína quimérica de la invención. Los dominios de polipéptido degrón de dedo de zinc (dominio(s) del sustrato del polipéptido CRBN capaz de unirse a CRBN en respuesta al fármaco, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina de la proteína quimérica) pueden incluirse como dominios de polipéptido degrón únicos o como dominios de polipéptido degrón múltiples, opcionalmente donde los dominios de polipéptido degrón múltiples se unen en una serie o un conjunto, opcionalmente utilizando enlazadores de polipéptido, como los conocidos en la técnica.

Como también comprenderá el experto, dentro de un dominio de unión a sustrato polipeptídico CRBN utilizado en el método de la invención, diferentes partes (por ejemplo, un giro beta y una hélice alfa) pueden ser directamente adyacentes entre sí, o pueden estar unidas utilizando enlazadores polipeptídicos (incluyendo pequeños tramos de aminoácidos), como los conocidos en la técnica.

Los fármacos (por ejemplo, moléculas pequeñas) adecuados para regular la degradación de las proteínas quiméricas de acuerdo con la invención que comprenden una o más de dichas proteínas, fragmentos o dominios de dedos de zinc C₂H₂ incluyen los denominados fármacos inmunomoduladores de imida (IMiD), incluyendo, pero sin limitarse a talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avandomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885 (véase, por ejemplo, Matyskiela et al., *J. Med. Chem.* 2018, 61, 2, 535-542; 2017; doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01921 y Gao et al., *Biomarker Research* (2020) 8: 2; doi.org/10.1186/s40364-020-0182-y). El experto sabe cómo seleccionar un fármaco adecuado, por ejemplo, un IMiD adecuado para su uso en el método de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, se proporciona para la célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el fármaco que permite que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, es un IMiD, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avandomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885.

Por lo tanto, se proporciona una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además un fármaco que permite que el dominio de sustrato del polipéptido CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferentemente en el que el fármaco es un IMiD, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avandomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885, preferentemente en el que dicho fármaco se une al dominio del sustrato polipeptídico CRBN.

Como comprenderá el experto, el polipéptido quimérico de la invención puede estar presente en diferentes formas en la célula de la invención. Por ejemplo, en caso de que el dominio de estabilidad de la proteína regulada por pequeñas moléculas (o dominio de desestabilización regulable) sea un SED, dependiendo de la presencia del compuesto pequeño afín/inhibidor de proteasa, el polipéptido quimérico puede estar presente en la célula con o sin la secuencia de degrón.

También se proporciona para la célula de acuerdo con la invención en la que el ITAM es un ITAM comprendido en un complejo de receptor de células T (TCR) y/o un receptor de antígeno quimérico (CAR) y/o un complejo NKR, preferiblemente un ITAM comprendido en una cadena zeta de CD3, una cadena épsilon de CD3, una cadena delta de CD3, una cadena gamma de CD3, una cadena gamma del receptor de inmunoglobulina FcεRI y DAP12.

Como se ha discutido, el dominio SH2 puede ser de una proteína que se une a un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada (ITAM).

Los ITAM se encuentran en los dominios intracelulares de moléculas de señalización celular como las cadenas zeta (ζ) de CD3, épsilon (ε) de CD3, gamma (γ) de CD3 y delta (δ) de CD3 del complejo receptor de células T y ciertos receptores Fc (Love et al., *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Jun; 2(6): a002485).

En las células NK, ciertos receptores activadores de células NK (NKR) forman complejos con moléculas de señalización portadoras de ITAM, como la cadena zeta de CD3, la cadena gamma (γ) del receptor de inmunoglobulina FcεRI y DAP12. Por ejemplo, los receptores de células NK (NKR) NKp46 y NKp30 se asocian con la cadena gamma (γ) del receptor de inmunoglobulina FcεRI y la cadena ζ de CD3, mientras que NKp44 se asocia con el adaptador de señalización DAP12 (Barrow et al., *Front Immunol.* 2019; 10: 909). Por lo tanto, en una realización de la invención actual, la célula de acuerdo con la invención es una célula NK.

Los dominios portadores de ITAM también se utilizan en diseños de receptores de antígenos quiméricos (CAR). La cadena zeta de CD3 contiene tres ITAM, mientras que la cadena épsilon de CD3, la cadena gamma (γ) del receptor de inmunoglobulina FcεRI y los dominios de señalización DAP12 contienen un ITAM y se utilizan en varios diseños de CAR (Ren-Heidenreich et al., *Cancer Immunol Immunother.* 2002 Oct; 51(8): 417-23, Nolan et al., *Clin Cancer Res.* 1999 Dec; 5(12): 3928-41, Töpfer et al., *J Immunol.* 2015 Apr 1; 194(7): 3201-12).

Dos residuos de tirosina dentro de ITAM son fosforilados por miembros de la familia Src-quinasa tal como Lck. Los ITAM fosforilados actúan como plataforma de acoplamiento para los dominios SH2 de Zap70 y Syk (Long et al., Annu Rev Immunol. 2013; 31: 10.1146/annurev-immunol-020711-075005).

5 La media firma ITAM puede reconocerse fácilmente como una tirosina separada de una leucina o isoleucina por otros dos aminoácidos cualesquiera, produciendo la firma YxxL/I. Dos de estas firmas están separadas por entre 6 y 8 aminoácidos para constituir la secuencia consenso ITAM de YxxL/Ix(6-8)YxxL/I. En una realización preferida, el dominio que contiene ITAM puede ser o comprender un dominio de cadena zeta de CD3. En otra realización preferida, el dominio que contiene ITAM puede ser o comprender un dominio de cadena épsilon de CD3. Sin embargo, en otra realización preferida, el dominio que contiene ITAM puede ser o comprender una
10 cadena gamma (γ) del receptor de inmunoglobulina Fc ϵ R1. Sin embargo, en otra realización preferida, el dominio que contiene ITAM puede ser o comprender un dominio DAP12.

También se proporciona para la célula de acuerdo con la invención donde la célula comprende además un receptor de célula T (complejo receptor de célula T) y/o un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de célula NK (complejo receptor de célula NK), preferentemente donde la célula es una célula T, célula T CAR,
15 célula NK y/o célula NK CAR.

Preferiblemente, la célula es una célula T que expresa un complejo TCR y/o un complejo CAR. Preferiblemente, el complejo TCR o el complejo CAR comprenden un dominio de cadena zeta de CD3 que comprende un ITAM, o cualquier otro dominio portador de ITAM divulgado en el presente documento.

Preferiblemente, la célula es una célula NK que expresa un complejo NKR y/o un complejo CAR. Preferiblemente, el complejo NKR o el complejo CAR comprenden un dominio de cadena zeta de CD3 que comprende un ITAM, o cualquier otro dominio portador de ITAM divulgado en el presente documento.
20

El experto conoce bien las células T y/o las células T CAR. Las células T o linfocitos T desempeñan un papel fundamental en la inmunidad mediada por células. Pueden distinguirse de otros linfocitos, como las células B y las células asesinas naturales (células NK), por la presencia de un receptor de células T (TCR) en la superficie celular.
25

Hay varios tipos de células T, incluyendo, pero no limitadas a células T colaboradoras (células TH), células T citolíticas y células T reguladoras. Las células TH expresan CD4 en su superficie y se activan cuando se les presentan antígenos peptídicos en la superficie de células presentadoras de antígenos (APC). Estas células pueden diferenciarse en uno de varios subtipos que segregan diferentes citocinas para facilitar distintos tipos de respuestas inmunitarias.
30

Las células T citolíticas (células TC o CTL) destruyen las células infectadas viralmente y las células tumorales, y también están implicadas en el rechazo de trasplantes. Los CTL expresan CD8 en su superficie. Estas células reconocen sus dianas uniéndose al antígeno asociado al MHC de clase I, presente en la superficie de todas las células nucleadas.

35 Las células T reguladoras (Treg) inhiben las reacciones inmunitarias, por ejemplo, mediante la secreción de moléculas como la IL-10, y estas células se caracterizan por la expresión del factor de transcripción FOXP3.

Las células T de memoria son un subconjunto de células T específicas de antígeno que persisten a largo plazo tras la resolución de una infección. Se expanden rápidamente a un gran número de células T efectoras tras la reexposición a su antígeno afín, proporcionando así al sistema inmunitario "memoria" contra infecciones pasadas. Las células de memoria pueden ser CD4+ o CD8+.
40

Preferiblemente, la célula T es una célula T positiva para CD4. Preferiblemente, la célula T es una célula T positiva para CD8. Una célula T CAR es una célula T que expresa un complejo CAR.

Las células asesinas naturales (o células NK) son un tipo de células citolíticas que forman parte del sistema inmunitario innato. Las células NK proporcionan respuestas a las señales innatas de las células infectadas viralmente de forma independiente del MHC peptídico.
45

Las células NK se definen como linfocitos granulares grandes y constituyen el tercer tipo de células diferenciadas a partir del progenitor linfoide común que genera los linfocitos B y T. Se sabe que las células NK se diferencian y maduran, por ejemplo, en la médula ósea, los ganglios linfáticos, el bazo, las amígdalas y el timo.

50 Las células de la invención pueden ser cualquier tipo de célula, en particular una célula T, una célula T CAR, una célula NK o una célula NK CAR.

Las células T (incluidas las células T CAR) o las células NK (incluidas las células NK CAR) que expresan las moléculas de la invención pueden crearse *ex vivo*, por ejemplo, a partir de la sangre periférica del propio paciente o de la sangre periférica de un donante.

También se proporciona para la célula de acuerdo con la invención donde el dominio SH2 es de una proteína seleccionada del grupo que consiste en Zap70, Syk, y Lck.

Se encontró que en particular los polipéptidos quiméricos de acuerdo con la invención que comprenden una primera parte que comprende dominios SH2 de Zap70, Syk y Lck son adecuados de acuerdo con la invención actual.

ZAP70 es una proteína que normalmente se expresa cerca de la membrana celular de las células T y de las células asesinas naturales. Desempeña un papel fundamental en la señalización de las células T. Su peso molecular es de 70 kDa, y está compuesta por 2 dominios SH2 del terminal N y un dominio quinasa del terminal C. Pertenece a la familia de las proteínas tirosina quinasa. La proteína humana ZAP70 tiene el número de acceso UniProtKB P43403. Esta secuencia tiene una longitud de 619 aminoácidos y se muestra como la SEQ ID NO 37.

Syk se expresa en timocitos, células T gammadelta intraepiteliales, células T alfabeta sin modificar y células B (Latour et al., Mol Cell Biol. 1997 Aug; 17(8): 4434-4441). Syk es altamente homóloga a ZAP70 y tiene la misma estructura de dominio de 2 dominios SH2 del terminal N y un dominio quinasa del terminal C. En las células B, la deficiencia de Syk puede ser reconstituida por Zap70 (Kong et al., Immunity. 1995 May; 2(5): 485-92). De forma similar, la deficiencia de ZAP70 puede ser reconstituida por Syk en células T (Williams et al., Mol Cell Biol. 1998 Mar; 18(3):1388-99). La proteína Syk humana tiene el número de acceso UniProtKB P43405. Esta secuencia tiene una longitud de 635 aminoácidos y se muestra como la SEQ ID NO 38.

Lck (también conocida como p56-LCK) se expresa en los linfocitos. Lck desempeña un papel fundamental en la vía de transducción de señales del TCR. En las células T, se asocia de forma constitutiva con los dominios citoplasmáticos de los correceptores CD4 y CD8. La activación del TCR por el complejo péptido-MHC acerca la Lck al complejo TCR y, por lo tanto, los residuos ITAM de las subunidades CD3 son fosforilados por la Lck. Los ITAM fosforilados funcionan como sitios de acoplamiento para los dominios SH2 de Zap70 (Simeoni, Oncotarget. 2017 Nov 28; 8(61): 102761-102762). La estructura de dominio de Lck es un dominio único SH4 (UD)-SH3-SH2-dominio cinasa. El dominio SH2 es necesario para la interacción con los ITAM fosforilados, mientras que el SH4 es necesario para la asociación con la membrana (Ngoenkam et al., Immunology. 2018 Jan; 153(1): 42-50). La proteína Lck humana tiene el número de acceso UniProtKB P06239. Esta secuencia tiene una longitud de 509 aminoácidos y se muestra como la SEQ ID NO 39.

Preferiblemente Zap70, Syk y Lck son Zap70, Syk y Lck humanas.

También se proporciona una célula de acuerdo con la invención en la que el polipéptido quimérico comprende más de un dominio SH2 de una proteína que se une a un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada.

Aunque de acuerdo con la invención la presencia de un dominio SH2 en el polipéptido quimérico es adecuada, en algunas realizaciones más de un dominio SH2 que puede unirse a un ITAM fosforilado, preferiblemente un ITAM fosforilado que está presente en un receptor de células T (complejo) o CAR (complejo) o NKR (complejo) puede estar comprendido en la primera parte del polipéptido quimérico (como se explica en el presente documento en otra parte, la primera parte del polipéptido quimérico se refiere a una parte que comprende un dominio SH2 de una proteína que se une a un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada (ITAM). Tal como se divulga en el presente documento, esta primera parte puede estar presente en cualquier parte del polipéptido quimérico de acuerdo con la invención; "primera parte" no implica necesariamente "en el terminal N". Lo mismo se aplica a la segunda y tercera parte del polipéptido quimérico tal como se define y divulga en el presente documento, y tal como se discute en el presente documento). Más de un dominio SH2 puede proceder de la misma proteína (natural) o de dos o más proteínas diferentes.

Como comprenderá el experto, se contempla que junto a, por ejemplo, los dominios SH2, pueden incluirse otros dominios en la primera parte del polipéptido quimérico, por ejemplo, dominios como los presentes en los polipéptidos quiméricos ensayados en los Ejemplos.

También se proporciona una célula de acuerdo con la invención en la que el ITIM y/o ITSM es de una proteína receptora inhibidora, preferiblemente una proteína receptora inmunitaria inhibidora, preferiblemente de una proteína seleccionada del grupo que consiste en PD1, BTLA, SIRPalfa, SIGLEC5, SIGLEC9, SIGLEC11, PECAM1 o LY9. Preferiblemente, la proteína del receptor inhibidor, la proteína del receptor inmunitario inhibidor o la proteína seleccionada del grupo formado por PD1, BTLA, SIRPalfa, SIGLEC5, SIGLEC9, SIGLEC11, PECAM1 o LY9 es humana.

PD1 (también conocida como PD-1) está codificada por el gen PDCD1. La PD1 es una proteína transmembrana de tipo I. La interacción con sus ligandos PD-L1/PD-L2 provoca la subregulación de las funciones efectoras de las células T citotóxicas. La PD1 humana tiene el número de acceso UniProtKB Q15116. Esta secuencia tiene 288 aminoácidos de longitud. El dominio citoplasmático de PD1 contiene un motivo ITIM y un motivo ITSM. El ITSM fosforilado en el dominio citoplasmático de PD1 recluta a la fosfatasa SHP-2, que desfosforila moléculas de señalización clave en la vía de señalización del TCR, tales como ZAP70, PKCtheta y zeta de CD3 (CD247),

y provoca la subregulación de la señalización del TCR (Bardhan et al., *Front Immunol.* 2016; 7: 550) y la coestimulación mediada por CD28 (Hui et al., *Science.* 2017 Mar 31; 355(6332): 1428-1433). Por ejemplo, una tercera parte adecuada que comprende un motivo conmutador basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM), preferiblemente un ITSM y un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) que podría utilizarse en el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención se caracteriza por la SEQ ID NO 17 (que representa el dominio citoplasmático de PD1).

El atenuador de linfocitos B y T (BTLA) se expresa principalmente en células T, células B y linfocitos maduros (Yue et al., *Front Immunol.* 2019; 10: 617). Es un receptor regulador inmunitario que desempeña un papel fundamental en la tolerancia inmunitaria. Al igual que PD1, BTLA es una glicoproteína transmembrana de tipo I. La unión del receptor BTLA induce el reclutamiento de SHP-1/SHP-2 y la subregulación de la secreción de IL-2 en células T (Watanabe et al., *Nat Immunol.* 2003 Jul; 4(7):670-9). La proteína BTLA humana tiene el número de acceso UniProtKB Q7Z6A9. Esta secuencia tiene 289 aminoácidos de longitud. El dominio citoplasmático de BTLA contiene un motivo ITIM y un motivo ITSM.

Por ejemplo, una tercera parte adecuada que comprende un motivo conmutador basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM), preferiblemente un ITSM y un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) que podría utilizarse en el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención se caracteriza por la SEQ ID NO 15 (que representa el dominio citoplasmático de BTLA).

SIRPA (también conocido como SIRPalfa, SIRP α , BIT, MFR, MYD1, PTPNS1, SHPS1, SIRP) se expresa en células mieloides. Al unirse a su ligando CD47, regula negativamente la fagocitosis, la activación de mastocitos y la activación de células dendríticas (Timms et al., *Curr Biol.* 1999 Aug 26; 9(16):927-30, Latour et al., *J Immunol.* 2001 Sep 1; 167(5):2547-54, Matlung et al., *Immunol Rev.* 2017 Mar; 276(1):145-164. doi: 10.1111/imr.12527). En los macrófagos, SIRPA se asocia principalmente con SHP-1 (Veillette et al., *J Biol Chem.* 1998 Aug 28; 273(35):22719-28). SIRPA es una proteína transmembrana de tipo I. La proteína humana SIRPA tiene el número de acceso UniProtKB P78324. Esta secuencia tiene una longitud de 504 aminoácidos. El dominio citoplasmático de SIRPA contiene dos ITIM y un motivo ITSM.

Por ejemplo, una tercera parte adecuada que comprende un motivo conmutador basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM), preferiblemente un ITSM y un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) que podría utilizarse en el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención se caracteriza por la SEQ ID NO 19 (que representa el dominio citoplasmático de SIRPa).

PECAM1 (también conocida como PECAM-1, CD31) se expresa en células T, células B, plaquetas, monocitos, macrófagos y neutrófilos (Newton-Nash et al., *J Immunol.* 1999 Jul 15; 163(2): 682-8). PECAM1 inhibe la señalización de células T y B mediante el reclutamiento de SHIP1, SHP-1 y SHP-2 (Marelli-Berg et al., *J Cell Sci.* 2013 Jun 1; 126(Pt 11): 2343-52). En los macrófagos, la unión del ligando a PECAM1 provoca el reclutamiento de SHP-1 y SHP2, la subregulación de la producción de TNF-alfa, IL-6 e IFN-beta y la señalización de TLR4 (Rui et al., *J Immunol.* 2007 Dec 1; 179(11): 7344-51). PECAM1 regula negativamente la vía de señalización de las plaquetas (Jones et al., *FEBS Lett.* 2009 Nov 19; 583(22): 3618-24). PECAM1 es una proteína transmembrana de tipo I. La proteína humana PECAM1 tiene el número de acceso UniProtKB P16284. Esta secuencia tiene una longitud de 738 aminoácidos. El dominio citoplasmático de PECAM1 contiene un motivo ITIM y un motivo ITSM. Por ejemplo, una tercera parte adecuada que comprende un motivo conmutador basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM), preferiblemente un ITSM y un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) que podría utilizarse en el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención se caracteriza por la SEQ ID NO 18 (que representa el dominio citoplasmático de PECAM1).

Las lectinas de tipo inmunoglobulina de unión a ácido siálico (Siglecs) son un grupo de receptores reguladores inmunitarios, expresados principalmente en las células del sistema hematopoyético (Bornhöft et al., *Dev Comp Immunol.* 2018 Sep; 86: 219-231). SIGLEC5 (también conocido como CD33L2, OBBP2) se expresa en monocitos, neutrófilos y células B, SIGLEC9 se expresa en neutrófilos, monocitos, células dendríticas y células NK, mientras que SIGLEC11 se expresa en macrófagos (Macauley et al., *Nat Rev Immunol.* 2014 Oct; 14(10): 653-666). La mayoría de las Siglecs tienen motivos inhibidores ITIM/ITSM que reclutan SHP1 y SHP2 y actúan como reguladores negativos del sistema inmunitario (Crocker et al., *Nat Rev Immunol.* 2007 Apr; 7(4): 255-66, Avril et al., *J Biol Chem.* 2005 May 20; 280(20): 19843-51, Haas et al., *Cancer Immunol Res.* 2019 May; 7(5): 707-718, Angata et al., *J Biol Chem.* 2002 Jul 5; 277(27):24466-74). SIGLEC5, SIGLEC9 y SIGLEC11 son proteínas transmembrana de tipo I. Contienen motivos ITIM e ITSM en sus dominios citoplasmáticos. La proteína humana SIGLEC5 tiene el número de acceso UniProtKB O15389. Esta secuencia tiene una longitud de 551 aminoácidos. La proteína humana SIGLEC9 tiene el número de acceso UniProtKB Q9Y336. Esta secuencia tiene una longitud de 463 aminoácidos. La proteína humana SIGLEC11 tiene el número de acceso UniProtKB Q96RL6. Esta secuencia tiene una longitud de 698 aminoácidos. Por ejemplo, una tercera parte adecuada que comprende un motivo conmutador basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM), preferiblemente un ITSM y un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) que podría utilizarse en el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención se caracteriza por la SEQ ID NO 21, la SEQ ID NO 22 o la SEQ ID NO 20 (que representan los dominios citoplasmáticos de SIGLEC 5, 9 y 11, respectivamente).

El antígeno de superficie de los linfocitos T Ly-9 (también conocido como LY9, SLAMF3, CD229) se expresa en los timocitos y en los linfocitos T y B maduros (de la Fuente et al., Blood. 2001 Jun 1; 97(11):3513-20). Se ha informado de que interactúa con SHIP-1 y SHP-2 (Puñet-Ortiz et al., Front Immunol. 2018 Nov 16; 9: 2661) y contribuyen a la tolerancia celular periférica al funcionar como regulador negativo de la respuesta inmunitaria (de Salort et al., Front Immunol. 2013; 4: 225). LY9 es una proteína transmembrana de tipo I. La proteína humana LY9 tiene el número de acceso UniProtKB Q9HBM7. Esta secuencia tiene 655 aminoácidos de longitud. El dominio citoplasmático de LY9 contiene dos motivos ITSM. Por ejemplo, una tercera parte adecuada que comprende un motivo conmutador basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM), preferiblemente un ITSM y un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) que podría utilizarse en el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención se caracteriza por la SEQ ID NO 16 (que representa la cola citoplasmática de LY9).

En algunas realizaciones el ITSM y el ITIM se obtienen o derivan de la misma proteína inhibidora, en otras realizaciones el ITSM y el ITIM derivan cada uno de una proteína inhibidora diferente.

También se proporciona una célula de acuerdo con la invención en la que el polipéptido quimérico comprende un ITSM y un ITIM.

Se descubrió sorprendentemente que la presencia tanto de un ITSM como de un ITIM en la tercera parte comprendida en el polipéptido quimérico de la invención es particularmente ventajosa (véanse los ejemplos).

También se proporciona una célula de acuerdo con la invención en la que, preferiblemente, la primera parte está situada en el terminal N del polipéptido quimérico, y en la que la segunda parte está situada en el terminal C del polipéptido quimérico, y preferiblemente en la que la tercera parte está situada entre la primera parte y la segunda parte.

También se divulga en el presente documento en otra parte, la primera parte y la tercera parte pueden ser directamente adyacentes entre sí o pueden estar separadas por tramos adicionales de aminoácidos. Tal como se divulga en el presente documento, la segunda parte y la tercera parte pueden ser directamente adyacentes o estar separadas por tramos adicionales de aminoácidos. Aunque no está limitado por ningún orden en particular, se observó que este orden particular de la primera, segunda y tercera parte puede ser ventajoso.

También se da a conocer una célula de acuerdo con la invención que comprende además un inhibidor de proteasa unido a la proteasa reprimible o que comprende además un Protac unido al dominio de unión de la quimera dirigida a la proteólisis (Protac), o que comprende además un fármaco que permite que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avadomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885, tal como se divulga y discute en el presente documento en otra parte. En una realización preferida, el inhibidor de proteasa es un inhibidor de proteasa como se describe en el presente documento. En una realización preferida, el Protac es un Protac como se describe en el presente documento. En una realización preferida, el dominio de sustrato del polipéptido CRBN capaz de unirse a la proteína CRBN en respuesta a un fármaco, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico es uno de los descritos en el presente documento, preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD, seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avadomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885

También se divulga la célula de acuerdo con la invención en la que

a) el dominio SH2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 7-11 o comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 12 - 14;

b) la primera parte del polipéptido quimérico comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 7 - 11 o comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 12 - 14;

c) el ITAM es YxxL/Ix(6-8)YxxL/I;

d) el dominio SH2 es un dominio SH2 que se une a una ITAM fosforilada comprendida en la SEQ ID NO 1 - 6, o que se une a una secuencia de aminoácidos que tiene un 80% o más de identidad con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 1- 6;

e) el ITIM es S/I/V/LxYxxI/V/L, y/o el ITSM es TxYxxV/I;

f) el ITSM y/o ITIM es un ITSM y/o ITIM comprendido en la SEQ ID No 15 - 22;

g) la tercera parte del polipéptido quimérico comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 15 - 22;

h) la segunda parte del polipéptido quimérico comprende o consiste en un segundo aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 35 o 40 o la SEQ ID NO: 41 - 57; y/o

i) el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 80% o más de identidad con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 23 - 34, la SEQ ID NO 36, o la SEQ ID NO 58 - 68.

5 El experto comprenderá que cualquier secuencia de aminoácidos definida relevante para la primera parte del polipéptido quimérico puede combinarse con cualquier secuencia de aminoácidos definida relevante para la tercera parte del polipéptido quimérico y/o la segunda parte del polipéptido quimérico. En otras palabras, cualquier primera parte según se divulga en el presente documento, cualquier segunda parte según se divulga y cualquier tercera parte según se divulga en el presente documento pueden combinarse para formar, respectivamente, la primera, segunda y tercera parte del polipéptido quimérico de acuerdo con la invención. En
10 una realización preferida, la primera parte del polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos como se define en a), b), c) y/o d) y la tercera parte del polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos como se define en e), f), o g). Como se desprende de la divulgación, diferentes primeras partes de las proteínas quiméricas pueden combinarse con diferentes terceras partes del polipéptido quimérico.

15 El experto también comprenderá que, además de la secuencia de aminoácidos en la primera, segunda y tercera parte de las proteínas quiméricas, tal como se definen en el presente documento, el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención también puede comprender partes adicionales. En otras palabras, los polipéptidos quiméricos divulgados en el presente documento no se limitan únicamente a los polipéptidos quiméricos que sólo constan de la primera, segunda y tercera parte definidas en el presente documento. Los polipéptidos quiméricos de acuerdo con la invención pueden comprender (tramos) adicionales de aminoácidos o partes
20 (funcionales) adicionales.

De este modo, el dominio SH2, tal como está presente en la primera parte del polipéptido quimérico, puede en una realización preferida comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad, preferiblemente al menos 81, 83, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% de identidad, con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 7-11 o comprende o consiste en una secuencia
25 de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad, preferiblemente al menos 81, 83, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% de identidad con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 12 - 14. Como comprenderá el experto, también se incluyen las secuencias definidas anteriormente en las que se han eliminado, sustituido o insertado 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 aminoácidos.

30 De este modo, la primera parte del polipéptido quimérico puede, en una realización preferida, comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80% de identidad, preferiblemente al menos 81, 83, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o un 100% de identidad, con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 7-11 o comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad, preferiblemente al menos 81, 83, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100%
35 de identidad, con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 12 - 14. Como comprenderá el experto, también se incluyen las secuencias definidas anteriormente en las que se han eliminado, sustituido o insertado 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 aminoácidos. La primera parte también puede comprender (tramos) adicionales de aminoácidos adyacentes a los aminoácidos definidos anteriormente siempre que la primera parte del polipéptido quimérico siga siendo funcional en el contexto de la presente invención.

40 De este modo, el ITAM al que se une el dominio SH2 de la primera parte del polipéptido quimérico cuando el ITAM está fosforilado es YxxL/Ix(6-8)YxxL/I, como se ha explicado anteriormente.

De este modo, el dominio SH2, tal como está presente en la primera parte del polipéptido quimérico, puede ser en una realización preferida un dominio SH2 que se une a un ITAM fosforilado comprendido en la SEQ ID NO 1 - 6, o que se une a una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad, preferiblemente al menos 81, 83, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% de identidad, con una secuencia de aminoácidos
45 de acuerdo con la SEQ ID NO 1-6.

De este modo, la tercera parte del polipéptido quimérico, que comprende un ITSM, preferentemente un ITSM y un ITIM puede comprender un ITSM y/o un ITIM en el que el ITIM es S/I/V/LxYxxI/V/L, y/o el ITSM es TxYxxV/I.

De este modo, el ITSM y/o ITIM que está comprendido en la tercera parte del polipéptido quimérico puede ser un ITSM y/o ITIM que está comprendido en la SEQ ID No. 15 - 22.

50 De este modo, la tercera parte del polipéptido quimérico puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80% de identidad, preferiblemente al menos 81, 83, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% de identidad, con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 15 - 22. Como comprenderá el experto, también se incluyen las secuencias definidas anteriormente en las que se han eliminado, sustituido o insertado 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 aminoácidos. La tercera parte también puede
55 comprender (tramos) adicionales de aminoácidos adyacentes a los aminoácidos definidos anteriormente siempre que la tercera parte del polipéptido quimérico siga siendo funcional en el contexto de la presente invención.

De este modo, la segunda parte del polipéptido quimérico de acuerdo con la invención puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ NO 35 o la SEQ ID NO 40 o la SEQ ID NO: 41 - 57. Como comprenderá el experto, también se incluyen las secuencias definidas anteriormente y en las que se han eliminado, sustituido o insertado 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 aminoácidos. La tercera parte también puede comprender (tramos) adicionales de aminoácidos adyacentes a los aminoácidos definidos anteriormente siempre que la tercera parte del polipéptido quimérico siga siendo funcional en el contexto de la presente invención. También se contemplan aquellas secuencias de aminoácidos que tengan al menos un 80% de identidad, preferiblemente al menos 81, 83, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o un 100% de identidad, con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 35 o la SEQ ID NO: 40 o la SEQ ID NO: 41 - 57.

De este modo, el polipéptido quimérico comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad, preferiblemente al menos 81, 83, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% de identidad, con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 23 - 34, la SEQ ID NO 36, o la SEQ ID NO 58 - 68. Como comprenderá el experto, también se incluyen las secuencias definidas anteriormente y en las que se han eliminado, sustituido o insertado 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 15 aminoácidos. El polipéptido quimérico también puede comprender (tramos) adicionales de aminoácidos adyacentes a los aminoácidos definidos anteriormente siempre que el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención siga siendo funcional dentro del contexto de la presente invención.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, también se proporciona la proteína quimérica definida en el presente documento. La proteína quimérica puede estar presente en una célula o en cualquier otra forma.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, también se proporciona un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico de acuerdo con la invención.

Como se comprenderá, el ácido nucleico de acuerdo con la invención puede introducirse adecuadamente en una célula, por ejemplo, una célula T o célula T CAR o célula NK, y llevarse a expresión en dicha célula, expresando así el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención en dicha célula. El ácido nucleico puede introducirse en forma de vector o de plásmido. En alguna realización, el ácido nucleico de la invención se integra en el genoma de una célula, por ejemplo, una célula T o célula T CAR o célula NK. Dicha célula T puede, por ejemplo, utilizarse para introducir un receptor de célula T modificado y/o CAR.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico de la invención se introduce en una célula T o NK antes, después o al mismo tiempo que un ácido nucleico que codifica un receptor de células T (modificado) o CAR. Los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención y un ácido nucleico que codifica un receptor de células T (modificado) o CAR pueden introducirse utilizando dos vectores separados o utilizando un vector que comprenda ambos ácidos nucleicos. De forma similar, en algunas realizaciones el ácido nucleico de la invención se introduce en una célula NK antes, después o al mismo tiempo que un ácido nucleico que codifica un receptor de células NK (modificado) o CAR. Los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención y un ácido nucleico que codifica un receptor de células NK (modificado) o CAR pueden introducirse utilizando dos vectores separados o utilizando un vector que comprenda ambos ácidos nucleicos.

Para ello también se proporciona un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la invención.

Para ello también se proporciona una célula que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la invención.

También se proporciona para una composición farmacéutica que comprende una célula de acuerdo con la invención o que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Preferiblemente, la célula es una célula T o una célula T CAR o una célula NK o una célula NK CAR. Las células T pueden derivarse del paciente a tratar o pueden ser alogénicas.

La inmunoterapia, que implica la transferencia de células T autólogas específicas de antígeno generadas *ex vivo*, es una estrategia prometedora para tratar infecciones víricas y cáncer. Las células T utilizadas para la inmunoterapia pueden generarse por expansión de células T específicas de antígeno o por redirección de células T mediante ingeniería genética. Las células T específicas de antígeno para su uso en inmunoterapia se han generado con éxito mediante la transferencia genética de receptores de células T o receptores de antígenos quiméricos (CAR).

Con la presente invención ahora es posible proporcionar a un paciente que lo necesite terapia celular inmunitaria o inmunoterapia (por ejemplo, tratamiento con células T, células T CAR, células NK y células NK CAR) proporcionando al paciente células T, células T CAR, células NK o células NK CAR, y en el que la función de células T o células NK (por ejemplo, actividad citotóxica de células T o células NK y/o secreción de citocinas) de estas células puede regularse como se describe en el presente documento. La persona experta conoce bien los diversos métodos de terapia celular inmunitaria, que utilizan células T o receptores de antígeno quimérico o receptores de células T (genéticamente modificados), por ejemplo, de acuerdo con lo reseñado por Rosenberg et al., Science. 2015 Apr 3; 348(6230):62-8 y June et al., Science. 2018 Mar 23;359(6382):1361-1365) y células NK no modificadas o modificadas con CAR, de acuerdo con la revisión de Hu et al., Front

Immunol. 2019; 10: 1205, Kloess et al., Transfus Med Hemother. 2019 Feb; 46(1): 4-13 y Suen et al., Cancer Invest. 2018;36(8):431-457.

5 Las células de acuerdo con la invención, los polipéptidos quiméricos de acuerdo con la invención y/o los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención pueden, como comprenderá el experto basándose en la presente divulgación, utilizarse adecuadamente en tales terapias celulares inmunitarias.

Por lo tanto, también se proporciona para la célula de acuerdo con la invención el uso como un medicamento.

10 Para ello también se proporciona la célula de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto. Preferentemente, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cánceres hematológicos, en particular cánceres de células B, melanoma, cáncer de mama, cánceres colorrectales, cánceres de pulmón, cánceres de células renales y cánceres de próstata.

Preferiblemente, la célula para su uso como medicamento o para su uso en el tratamiento del cáncer es una célula T o una célula T CAR o una célula NK o una célula NK CAR.

También se proporciona una célula para su uso como medicamento, preferentemente para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto de acuerdo con la invención, en el que el tratamiento comprende

- 15 a) administrar al sujeto una población de células de acuerdo con la invención;
 b) opcionalmente, administrar al sujeto un inhibidor de la proteasa reprimible o un Protac que se una al dominio de unión de la quimera dirigida a la proteólisis (Protac) o un fármaco que permita que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD, preferiblemente
 20 seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avadomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885;
 c) opcionalmente, si se realiza el paso b), aumentar o reducir la concentración del inhibidor de la proteasa reprimible o el Protac o el fármaco que permite que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico,
 25 preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avadomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885.

30 Como se divulga en el presente documento en otra parte, la función de la célula T o la función de la célula NK de la célula de acuerdo con la invención puede regularse mediante la expresión del polipéptido quimérico de acuerdo con la invención. En ausencia del inhibidor de la proteasa reprimible (en caso de que un SED esté comprendido en la segunda parte del polipéptido quimérico) o en ausencia de un Protac que se una al dominio de unión a Protac en la segunda parte del polipéptido quimérico de la invención, o en ausencia del fármaco que permite que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avadomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885, la función de las células T se inhibe mediante la inhibición de la señalización del TCR o CAR por el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención o la función NK se inhibe mediante la inhibición de la señalización de NKR o CAR por el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención. En presencia de dicho inhibidor o dicho Protac o presencia del fármaco que permite que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la
 40 vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD, seleccionado preferentemente del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avadomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885, el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención se degradará, provocando la liberación de la inhibición de la función de células T o células NK (liberación de citocinas/citotoxicidad). Dado que la regulación de la función de las células T o la función NK es reversible y dependiente de la dosis, la
 45 función de las células T o la función NK puede regularse como parte del tratamiento del sujeto.

También se proporciona un método para proporcionar una célula de acuerdo con la invención, en el que el método comprende poner en contacto la célula con un ácido nucleico de acuerdo con la invención, preferiblemente en el que el ácido nucleico se pone en contacto con la célula *ex vivo*.

50 También se proporciona un método para controlar la expresión de un polipéptido quimérico en una célula, en el que el método comprende poner en contacto la célula que expresa el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención con un inhibidor de la proteasa reprimible o con un Protac que se une al dominio de unión de la quimera dirigida a la proteólisis (Protac) o con el fármaco que permite que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD, preferiblemente seleccionado del grupo
 55 que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avadomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885, preferiblemente en el que la célula se pone en contacto con el inhibidor de la proteasa reprimible o con el Protac o con el fármaco que permite que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente

en el que el fármaco es un IMiD, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avadomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885 *ex vivo* o, preferiblemente, *in vivo*.

5 La expresión del polipéptido quimérico de acuerdo con la invención se controla modulando el nivel o la concentración del polipéptido quimérico de acuerdo con la invención dirigiendo el polipéptido quimérico de acuerdo con la invención desde o hacia la degradación, como se divulga en el presente documento en otra parte.

También se proporciona un método para controlar la actividad citotóxica de células T y/o células NK y/o para controlar la secreción de citocinas por células T y/o células NK, en el que el método comprende

10 a) expresar un polipéptido quimérico de acuerdo con la invención en la célula T y/o la célula NK;
 b) poner en contacto la célula T y/o la célula NK con un inhibidor de la proteasa reprimible o con un Protac que se una al dominio de unión de la quimera dirigida a la proteólisis (Protac) o con un fármaco que permita que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD,
 15 (avadomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885;
 c) opcionalmente, aumentar o reducir la concentración del inhibidor de la proteasa reprimible o el Protac, o el fármaco que permite que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida,
 20 pomalidomida, CC-122 (avadomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885.

El experto conoce bien los métodos para determinar la actividad citotóxica de las células T y las células NK y/o la secreción de citocinas por dichas células T, por ejemplo, IFN γ , IL-2, TNF α , IL-10, IL-4 y células NK, por ejemplo, IFN γ , IL-2, TNF α . Las células T y/o las células NK pueden derivarse del paciente a tratar o pueden ser alogénicas.
 25

También se describe en el presente documento un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, en el que el método comprende

a) proporcionar al sujeto células de acuerdo con la invención;
 b) opcionalmente, administrar al sujeto un inhibidor de la proteasa reprimible o un Protac que se una al dominio de unión de la quimera dirigida a la proteólisis (Protac), o el fármaco que permita que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avadomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885;
 30 c) opcionalmente, si se realiza el paso b), aumentar o reducir la concentración del inhibidor de la proteasa reprimible o del Protac, o del fármaco que permite que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avadomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885. Las células T y/o las células NK pueden derivarse del paciente a tratar, o pueden ser alogénicas.
 40

También se describe un método de control de la actividad citotóxica de células T y/o células NK en un sujeto y/o de control de la secreción de citocinas por células T y/o células NK en un sujeto, en el que el método comprende

a) proporcionar células de acuerdo con la invención al sujeto;
 45 b) administrar al sujeto un inhibidor de la proteasa reprimible o un Protac que se una al dominio de unión de la quimera dirigida a la proteólisis (Protac), o un fármaco que permita que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avadomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885;
 50 c) opcionalmente, aumentar o reducir la concentración del inhibidor de la proteasa reprimible o el Protac, o un fármaco que permita que el dominio de sustrato del polipéptido CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avadomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885.

55 Las células T y/o células NK pueden derivarse del paciente a tratar o pueden ser alogénicas.

Se entenderá que todos los detalles, realizaciones y preferencias discutidos con respecto a un aspecto o realización de la invención son igualmente aplicables a cualquier otro aspecto o realización de la invención y

que por lo tanto no hay necesidad de detallar todos estos detalles, realizaciones y preferencias para todos los aspectos por separado.

Habiendo descrito ahora de forma general la invención, la misma se comprenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente invención. Otros aspectos y realizaciones serán evidentes para los expertos en la materia.

Ejemplos

Introducción general

Para desarrollar un sistema que pueda controlar reversiblemente la actividad de las células T que expresan cualquier receptor de antígeno de interés, se diseñó una estrategia en la que una señal inhibitoria es llevada al complejo de señalización CAR o TCR de una manera titulable. Una propiedad compartida de los receptores de antígenos CAR y TCR es que la señalización a través de estos receptores conduce a la fosforilación de motivos de activación basados en tirosinas inmunorreceptoras (ITAM). La unión del receptor de antígeno por un ligando agonista activa la Lck, que fosforila los ITAM en el complejo CD3. Tras la fosforilación de la cadena zeta de CD3, la proteína Zap70 es reclutada por los ITAM fosforilados de la cadena zeta de CD3 a través de sus dominios SH2.

Nos dimos cuenta de que cuando los dominios de señalización como los comprendidos en los receptores inhibidores se trasladaran a los receptores de antígenos activados por fusión con dominios SH2 que interactúan con ITAM, como el dominio SH2 de Zap70 o el dominio SH2 de otras proteínas que se unen a un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada (ITAM), como Syk y Lck, esto podría resultar en la atenuación de la señalización de TCR/CAR.

Tras la unión de sus ligandos naturales, una variedad de receptores inhibidores, incluyendo PD1, BTLA, SIRPalfa, SIGLEC5, SIGLEC9, SIGLEC11, PECAM1 y LY9 han demostrado ser capaces de interferir con la activación de células inmunes.

Para respaldar el concepto de suministro de dominio inhibitorio asistido por dominio SH2, inicialmente decidimos centrarnos en el dominio intracelular PD1, ya que la señalización sobre la producción de citocinas y la citotoxicidad es reversible (Barber et al., *Nature*. 2006 Feb 9;439(7077):682-7), y dado que se ha demostrado que la proximidad física de PD1 a las microagrupaciones de TCR es crucial para la supresión de células T (Yokosuka et al., *J Exp Med*. 2012 Jun 4; 209(6):1201-17). Basándonos en estas observaciones, generamos una proteína de fusión de cola PD1 con dominios con 2 dominios SH2 de Zap70 (en el presente documento en adelante abreviada como Zap70-PD1), con el objetivo de acercar el dominio inhibidor de PD1 al complejo TCR (Figura 1A-B). Los dominios 2xSH2 de Zap70 se unen a la cadena ζ de CD3 fosforilada e inician la vía de transducción de señales del TCR fosforilando las dianas secuencia abajo (Wang et al., *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 May; 2(5): a002279).

Para evaluar el efecto de Zap70-PD1 en la activación de células T, se transdujeron células T humanas primarias con un TCR de clase I restringido específico del neoantígeno CDK4 de alta afinidad (Stronen et al., *Science*. 2016 Jun 10;352(6291):1337-41), junto con la fusión Zap70-PD1, los dominios SH2 de Zap70 sin cola inhibitoria (2xSH2 de Zap70), el dominio intracelular PD1 (cola PD1), o un vector control.

El análisis de la producción de citocinas de células T (IFN γ , IL2, TNF α) o la desgranulación de células T (expresión de la superficie celular LAMP-1) tras la incubación con células tumorales T2 cargadas con el neoantígeno CDK4 demostró que la expresión de la cola libre de PD1 no alteraba sustancialmente la funcionalidad de las células T. La expresión de los dominios 2xSH2 de Zap70 sin la cola PD1 dio lugar a una modesta inhibición de las funciones de las células T (Figura 1C-D) que puede explicarse por la competencia con Zap70 de tipo silvestre endógeno.

En particular, cuando el dominio intracelular de PD1 se unió a los dominios SH2 de Zap70, se observó una supresión altamente eficiente tanto de la producción de citocinas de células T como de la desgranulación de células T (reducción del porcentaje de células que responden cuando las células T se cultivan conjuntamente con células tumorales T2 cargadas con péptido 10 nM: IFN γ : 104 veces; IL-2: 110 veces; TNF α : 81 veces; LAMP1 de la superficie celular: 40 veces, todos en relación con el control del vector, Figura 1C-D).

La inhibición de la funcionalidad de las células T se observó tanto en las células T CD8 como en las CD4. Además, la comparación del grado de inhibición de la actividad de las células T en poblaciones celulares modificadas genéticamente con diferentes niveles de expresión del reportero EGFP reveló que el nivel de expresión de Zap70-PD1 estaba correlacionado con la actividad inhibitoria, lo que sugiere que la regulación de los niveles de proteína Zap70-PD1 podría utilizarse para modular la función de las células T.

Para lograr un control farmacológico sobre los niveles de la proteína Zap70-PD1, generamos posteriormente proteínas de fusión con un dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas (por ejemplo, un degrón autoextirpante (SED), en el que el SED comprende una proteasa reprimible, un sitio de escisión afín

y una secuencia de deegrón, o un dominio de unión a quimeras dirigidas a la proteólisis (Protac)). La combinación de un dominio SH2 de unión a ITAM fosforilado, un motivo conmutador basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM), preferiblemente un ITSM y un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM), y un dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas se denomina también en el presente documento CRASH-IT (cola inhibidora regulada químicamente y liberada por SH2). Una realización de CRASH-IT que contiene la etiqueta Apagado asistido por moléculas pequeñas (etiqueta SMASh, Chung et al., Nat Chem Biol. 2015 Sep; 11 (9):713-20) como SED se ilustra en la Figura 2A-B. La etiqueta SMASh consiste en la proteasa NS3/4A del HCV más un deegrón que da lugar a una rápida degradación de la proteína por el proteasoma. En ausencia del inhibidor de la proteasa del HCV, la proteasa del HCV escinde el enlazador entre la proteína de interés y el deegrón, impidiendo así la degradación de la proteína. En cambio, en presencia de un inhibidor de la proteasa NS3/4A del HCV, toda la proteína de fusión se dirige al proteasoma y, por lo tanto, se degrada.

Para comprobar si el nivel de la proteína de fusión Zap70-PD1 puede controlarse de esta manera, generamos una proteína de fusión Zap70-PD1-SMASh etiquetada con HA en el terminal N y la introdujimos en células T humanas. El análisis de los niveles de proteína de fusión mediante tinción intracelular reveló que la inhibición de la actividad de la proteasa por el inhibidor de la proteasa NS3/4A del HCV asunaprevir dio lugar a una reducción de los niveles de proteína de fusión tanto en células CD8 como CD4 humanas primarias, observándose una inhibición semimáxima en torno a 0.2 μ M (Figura 2C-D).

Es importante destacar que la proteína de fusión Zap70-PD1-SMASh retuvo la capacidad de la proteína de fusión Zap70-PD1 de impedir la activación de células T, y esta inhibición de la función de células T pudo ahora revertirse mediante la adición de asunaprevir tanto para células T CD8 humanas primarias (Figura 2E) como para células T CD4 (Figura 2G).

Específicamente, en relación con las células tratadas con DMSO, la activación de células T CD8+ por células diana cargadas con péptidos (10 nM) se incrementó 8.8x, 11.5x, 6.3x y 6.6x veces para IFN γ , IL2, TNF α y expresión de LAMP1 en la superficie celular, respectivamente. Como control, las funciones efectoras de las células T negativas para la proteína de fusión Zap70-PD1-SMASh (control del vector) no se vieron alteradas por el inhibidor de la proteasa (Figura 2F y Figura 2H). Observamos que el efecto de asunaprevir sobre la función de las células T modificadas con Zap70-PD1-SMASh es profundo (Figura 2E) incluso cuando sus efectos sobre los niveles de proteína de fusión son modestos (Figura 2C), lo que refleja potencialmente las propiedades de amplificación de señal de la vía de señalización del TCR que la hace altamente sensible a la intensidad de la señal.

Un conmutador de seguridad utilizado en terapias de células T adoptivas debería ser idealmente titulable y reversible. Se demostró una recuperación dependiente de la dosis de la funcionalidad de las células T analizando el efecto de concentraciones crecientes de asunaprevir en cultivo conjunto de células diana cargadas de antígeno y células T específicas de CDK4 modificadas con el conmutador Zap70-PD1-SMASh (Figura 3A-C), lo que demuestra que las células T pueden ajustarse para alcanzar una sensibilidad al antígeno deseada. A continuación, para entender si la plataforma CRASH-IT puede actuar como un regulador reversible de las células T, para cambiarlas de un estado activo a uno inactivo y viceversa, se lavaron las células T tratadas con asunaprevir y las tratadas con el control y se cultivaron durante 72 horas en ausencia del fármaco. Posteriormente, las células T se trataron de nuevo con asunaprevir o se dejaron sin tratar y se expusieron a células diana cargadas de antígeno (esquema experimental en la Figura 3A). Notablemente, las células T modificadas con Zap70-PD1-SMASh sólo mostraron una actividad sustancial cuando se expusieron a asunaprevir durante el tiempo de cultivo conjunto tumoral, e independientemente de si las células habían sido expuestas previamente a asunaprevir o no. En otras palabras, la activación previa del conmutador CRASH-IT no altera el resultado durante el uso posterior, lo que demuestra la reversibilidad de la plataforma (Figura 3D).

La recuperación de la función de las células T inducida por moléculas pequeñas también se demostró en experimentos de cultivo conjunto utilizando los melanomas Mel526 y NKIRTL006 que expresan endógenamente el neoantígeno CDK4 mutante, mientras que las células de melanoma MM90904 de control que expresan el gen CDK4 de tipo silvestre no se vieron afectadas (datos no mostrados).

Para caracterizar los dominios proteicos esenciales para lograr la inhibición reversible de células T, comparamos versiones etiquetadas con SMASh de 2xSH2 de Zap70 y Zap70-PD1 y también una versión etiquetada con SMASh de Zap70-PD1 que carecía del dominio de deegrón (datos no mostrados). Como se observó para los conmutadores proteicos que carecían del dominio SMASh (Figura 1), la presencia de la cola PD1 utilizada era importante para lograr un control estricto de la señalización de TCR, y la restauración de la actividad de las células T tras la activación del conmutador CRASH-IT requería la presencia del deegrón que induce la degradación proteasomal.

A continuación, exploramos la activación mediada por PROTAC de la plataforma CRASH-IT sustituyendo la etiqueta SMASh por un dominio FKBP12^{F36V} (Figura 4A-B). La presencia de la molécula heterobifuncional dTAG-13 conduce a una rápida degradación proteasomal de las proteínas de fusión FKBP12^{F36V} al inducir la dimerización con el complejo CRBN E3 ligasa (Nabet et al., Nat Chem Biol. 2018 May; 14(5):431-441). Los experimentos de titulación con moléculas pequeñas revelaron que la activación de la plataforma CRASH-IT

utilizando picos de PROTAC dTAG-13 en torno a 0.5 μ M, mientras que se requerían concentraciones sustancialmente mayores de inhibidores NS3/4A del HCV para niveles de activación similares (Figura 4C-E). Además, la sustitución de la etiqueta SMASh por el dominio FKBP12^{F36V} redujo la activación basal de las células T en el cultivo conjunto tumoral en ausencia de moléculas pequeñas. La razón de la mayor rigurosidad podría ser el mayor nivel de expresión del transgén, ya que FKBP12^{F36V} es 591 pb más corto que la etiqueta SMASh. Mediante la clasificación de células CDK4 TCR y Zap70-PD1-FKBP12^{F36V} (EGFP) transducidas conjuntamente en función de la expresión de EGFP y CD8 y su posterior expansión en dTAG-13 y medios con alto contenido de IL-2, generamos grupos de células T para su uso en ensayos de citotoxicidad. Las células CD8 clasificadas mostraron un aumento de la destrucción de células tumorales NKIRTL006 cargadas con ⁵¹Cr tras el tratamiento con dTAG-13, mientras que la actividad de las células T modificadas con vectores de control no se vio alterada (Figura 4F-G).

A continuación, probamos la flexibilidad del sistema conmutador CRASH-IT utilizando células T modificadas con un CAR de segunda generación. Cuando las células T humanas modificadas de cadena ζ anti-CD19-CD28-CD3 de CAR (Figura 5A) (Brentjens et al., Clin Cancer Res. 2007 Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35) fueron cultivadas conjuntamente con Raji o Daudi positivas para CD19 (Figura 5B), la producción y desgranulación de citocinas de estas células fue eficientemente suprimida por Zap70-PD1-SMASh, y estas funciones de las células T se recuperaron tras la adición de asunaprevir (Figura 5C-F).

Del mismo modo, la actividad funcional de las células T CD8 modificadas con un TCR específico de antígeno compartido con NY-ESO-1 (Linnemann et al., Nat Med. 2013 Nov; 19(11):1534-41) se evitó mediante el conmutador CRASH-IT y se restauró con la adición de asunaprevir (Figura 6).

Por último, cuando los complejos TCR endógenos en células T humanas primarias se estimularon con placas recubiertas de anticuerpos anti-CD3 o anti-CD3/CD28, la funcionalidad de las células T se suprimió de nuevo con CRASH-IT y se recuperó con la adición del fármaco (datos no mostrados).

La eficiencia de la degradación de proteínas inducida por asunaprevir fue mayor en las células CD8 que en las células CD4. Potencialmente debido a esto, la restauración de la función de las células T inducida por asunaprevir fue más profunda para las células T CD8+ que para las células T CD4+. Para empezar a explorar la viabilidad de crear sistemas de conmutador CRASH-IT variantes con un rango dinámico optimizado para diferentes tipos de células inmunitarias, creamos una versión modificada de Zap70-PD1-SMASh (Figura 7A) que mostró una supresión de células T ligeramente menos estricta en ausencia de asunaprevir en células CD8. El conmutador tuZap70-PD1-SMASh sintonizado conservó la capacidad de suprimir eficazmente la función de las células T CD4 modificadas con el TCR CDK4, pero la recuperación de las funciones de las células T tras la adición de asunaprevir mejoró notablemente (Figura 7B). Para comprobar si este sistema de conmutación también podría utilizarse para controlar el reconocimiento de células T CD4+ a través de HLA de clase II, transdujimos conjuntamente células T CD4+ humanas primarias con el conmutador tuZap70-PD1-SMASh y un TCR del CMV restringido a HLA de clase II, y se cultivaron conjuntamente las células resultantes con células diana CBH 5477 cargadas con péptidos. La sensibilidad al antígeno se redujo aproximadamente 1000 veces mediante la introducción del conmutador tuZap70-PD1-SMASh, y el tratamiento con asunaprevir dio lugar a una recuperación casi completa de las funciones de las células T CD4+ (Figura 7C-D), lo que demuestra cómo se pueden crear sistemas CRASH-IT optimizados para tipos celulares específicos. El tuZap70-PD1-SMASh se obtuvo añadiendo un residuo de aminoácido alanina que codifica el ADN del terminal N después del codón de inicio (también se probó un residuo de aminoácido valina y mostró resultados similares).

Desde un punto de vista conceptual, CRASH-IT contiene elementos funcionales que inducen la proximidad al receptor del antígeno, proporcionan la señal inhibitoria y ofrecen la posibilidad de regular la fuerza de esta señal inhibitoria. En el diseño que hemos desarrollado, estos elementos funcionales están formados por los dominios SH2 de Zap70, la cola de PD1 y un dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas (etiqueta SMASh o FKBP12^{F36V}), respectivamente.

Además, la inclusión de diferentes dominios inhibitorios de receptores que contienen ITIM e ITSM ofrece el potencial tanto de variar el nivel de supresión de células T como de dirigir dicha supresión a señales de salida específicas de células T. La Figura 8 y la Figura 9 muestran que, efectivamente, las construcciones que comprenden diferentes motivos ITSM y motivos ITIM de otras colas inhibitorias pueden mejorar la rigurosidad de los polipéptidos quiméricos y del sistema de acuerdo con la invención. Todos los dominios probados comprenden tanto un ITSM como un ITIM, excepto LY9, que sólo comprende dos dominios ITSM y ningún dominio ITIM (véase también la Figura 11). Además, la Figura 10 muestra que en la invención pueden utilizarse dominios de acoplamiento alternativos que contengan SH2. Todos los dominios SH2 alternativos ensayados interactúan con ITAM fosforilados (véase también la Figura 12) en el contexto de la invención actual (Katsuyama et al., Front Immunol. 2018; 9: 1088, Ngoenkam et al., Immunology. 2018 Jan; 153(1): 42-50, Koch et al., Trends Immunol. 2013 Apr; 34(4):182-91).

La amplia aplicabilidad de la plataforma CRASH-IT se demostró también en células NK. La línea de células NK KHYG-1 puede reconocer y eliminar eficazmente el tumor K562 deficiente en HLA de clase I y clase II utilizando sus receptores endógenos de activación de células NK (Suck et al., Exp Hematol. 2005 Oct; 33(10):1160-71).

La expresión del conmutador Zap70-PD1-FKBP12^{F36V} suprimió eficazmente la producción de IFN γ , IL2 y TNF α en células NK cultivadas juntamente con el tumor K562 en ausencia de fármaco, y la supresión se invirtió en presencia de PROTAC dTAG-13 (Figura 13).

5 Mientras que los diseños actuales de CAR comprenden frecuentemente dominios de señalización de la cadena zeta de CD3 que contienen ITAM, también se reportaron los dominios de señalización alternativos que contienen ITAM, como fragmentos de la cadena ϵ de CD3 (Nolan et al., Clin Cancer Res. 1999 Dec; 5(12): 3928-41), cadena γ del receptor de inmunoglobulina Fc ϵ RI (Ren-Heidenreich et al., Cancer Immunol Immunother. 2002 Oct; 51(8):417-23) y DAP12 (Töpfer et al., J Immunol. 2015 Apr 1;194(7):3201-12).
10 Probamos la compatibilidad del conmutador CRASH-IT con un panel de CAR que contenían dominios de señalización que contenían ITAM alternativos y mostramos la inhibición de las funciones de las células T en ausencia de fármaco, y la restauración inducida por fármaco de las funciones de las células T tras la adición de fármaco en células T que expresaban juntamente diferentes CAR y el conmutador CRASH-IT (Figura 14).

15 La realización de CRASH-IT que utiliza el dominio SMASh contiene secuencias proteicas derivadas del HCV que pueden ser potencialmente inmunogénicas en huéspedes inmunocompetentes. Otra realización de la plataforma CRASH-IT, basada en el dominio FKBP12^{F36V}, puede ser regulada por moléculas PROTAC como dTAG-13. Sin embargo, el tamaño de dTAG-13 (peso molecular: 1049.18) puede limitar su disponibilidad oral.

20 Por lo tanto, también evaluamos si era posible combinar el sistema de conmutación CRASH-IT con un dominio alternativo de control de estabilidad de proteínas que pueda ser regulado por pequeñas moléculas que sí muestren biodisponibilidad oral y que se utilicen clínicamente. Encontramos que las realizaciones CRASH-IT que comprendían un dominio de sustrato de polipéptido CRBN capaz de unirse a la proteína CRBN en respuesta a un fármaco, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico pueden emplearse con éxito en la presente invención. Esto se demostró utilizando realizaciones
25 CRASH-IT que comprendían, junto a la primera parte que comprendía un dominio SH2 de una proteína que se une a un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada y, preferiblemente, una tercera parte, que comprendía un motivo de conmutación basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM), preferiblemente un ITSM y un motivo inhibitor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM), y una segunda parte (es decir, la parte que comprende un dominio de estabilidad de proteínas regulado por moléculas pequeñas) que contiene degrones basados en dedos de zinc. Dichas realizaciones CRASH-IT pueden regularse con éxito mediante fármacos inmunomoduladores de imida (IMiD, también conocidos como moduladores de Cereblon) que
30 incluyen moléculas clínicamente aprobadas y disponibles por vía oral, como la talidomida, la lenalidomida y la pomalidomida.

35 Talidomida (peso molecular: 258.23), lenalidomida (peso molecular: 259.26) y pomalidomida (peso molecular: 273.24) son fármacos inmunomoduladores (IMiD) que se utilizan clínicamente para el tratamiento del mieloma múltiple. Trabajos anteriores han demostrado que la actividad de estos compuestos depende de la degradación de la proteína IKZF1, por ejemplo, dependiente de la ligasa E3 CRBN. Además, se ha demostrado que un motivo de dedo de zinc de 23 aminoácidos de longitud (dedo de zinc 2 de IKZF1, ZF2) dentro de la secuencia de IKZF1 constituye el degrón mínimo (o el dominio sustrato de un polipéptido CRBN) para la degradación de proteínas dependiente de talidomida, lenalidomida y pomalidomida. La combinación de la secuencia de IKZF1
40 ZF2 con el dedo de zinc adyacente 3 (IKZF1 ZF3) que interactúa con la interfaz CRBN-IKZF1 ZF2, da lugar a un degrón mejorado derivado de IKZF1 de ~57 aminoácidos de longitud (Sievers et al., Science. 2018 Nov 2;362(6414). pii: eaat0572). Esta secuencia de degrón mejorada puede, al igual que otro dominio del sustrato polipeptídico CRBN capaz de unirse a la proteína CRBN en respuesta a un fármaco, por ejemplo, fusionarse a una proteína de interés de forma que la estabilidad de la proteína resultante pueda regularse mediante la adición de talidomida, lenalidomida o pomalidomida o cualquier otro IMiD (Koduri et al., Proc Natl Acad Sci
45 USA. 2019 Feb 12;116(7):2539-2544).

50 La pomalidomida y la lenalidomida son IMiD de segunda generación que difieren de la talidomida por un grupo anilina en el anillo de ftalimida expuesto al disolvente en la posición C4. Se cree que la lenalidomida y la pomalidomida son más eficaces que la talidomida debido a la presencia de este grupo anilina. Tanto los efectos terapéuticos como los adversos de estos 3 fármacos (mielosupresión, actividad antiinflamatoria, coestimulación de células T, proliferación de células NK, efectos antiangiogénicos y teratogénicos) se solapan, pero difieren en magnitud entre los 3 fármacos. Las dosis iniciales recomendadas de talidomida, lenalidomida y pomalidomida son de 200 mg/día, 25 mg/día y 4 mg/día, respectivamente, lo que refleja sus diferencias de potencia.

55 Para regular los niveles de actividad de las células T con IMiD, se creó un conmutador CRASH-IT que comprendía los dominios 2xSH2 de Zap70, el dominio de señalización PD1 y el degrón óptimo IKZF1 ZF2-ZF3 (Figuras 15-16). Cuando las células T primarias fueron transducidas conjuntamente con un TCR CDK4 específico de neoantígeno más el conmutador CRASH-IT basado en IKZF1 y cultivadas conjuntamente con células tumorales NKIRTL006 que expresan endógenamente el neoantígeno CDK4, la producción de citocinas y la expresión de LAMP-1 en la superficie celular se suprimieron fuertemente en ausencia de IMiD, pero los niveles de actividad se restauraron robustamente en presencia de pomalidomida o lenalidomida, pero menos
60 en presencia de talidomida (Figura 16).

Los efectos antiinflamatorios de los IMiD podrían potencialmente interferir con la actividad de las terapias celulares en caso de que la inactivación del conmutador de seguridad requiriera altas concentraciones del fármaco. Por esta razón, es deseable crear degrones modificados que muestren una mayor afinidad por los IMiD, de forma que la regulación del conmutador de seguridad pueda lograrse a concentraciones de fármaco en las que la degradación de las dianas endógenas sea mínima. Anteriormente se informó de que un motivo híbrido de dedo de zinc que contiene la secuencia de giro beta de ZFP91 ZF4 y la secuencia de hélice alfa de IKZF1 ZF2 muestra una mayor afinidad por la talidomida, en comparación con las secuencias parentales ZFP91 ZF4 e IKZF1 ZF2 (Sievers et al., Science. 2018 Nov 2;362(6414). pii: eaat0572). En este análisis, la secuencia de IKZF1 ZF3 no se incluyó en el degrón dedo de zinc, aunque se informó por separado de que la secuencia de IKZF1 ZF2-3 muestra un potencial de degradación de proteínas superior al de la secuencia de IKZF1 ZF2.

Para generar degrones que interactúen con talidomida con alta afinidad, sustituimos la secuencia de giro beta IKZF1 ZF2 del degrón IKZF1 ZF2-3 por las secuencias de giro beta de varios dedos de zinc (ZNF653 ZF4, ZFP91 ZF4, ZNF276 ZF4, ZNF827 ZF1). El análisis de la actividad de las células T en función de la concentración de fármaco reveló que los dedos de zinc híbridos que contienen injertos de giro beta ZNF653, ZFP91, ZNF276 y ZNF827 podían inactivarse a una concentración reducida de lenalidomida, pomalidomida y talidomida, con una mejora particularmente profunda de la sensibilidad al fármaco para esta última (Figura 16). En concreto, la concentración de talidomida necesaria para alcanzar el mismo nivel de producción de citocinas (IFN γ , IL-2 o TNF α) o los niveles de expresión de LAMP-1 de superficie se redujo en torno a 1,000 veces (Figura 16D) para las células T que expresaban los degrones quiméricos en comparación con el degrón IKZF1 ZF2-3 parental. De este modo, los conmutadores CRASH-IT basados en dedos de Zn, como Zap70-PD1-ZFP91/IKZF1, pueden utilizarse para regular las funciones de las células T a concentraciones de talidomida en las que la unión de su ligando normal a la talidomida es mínima.

Notablemente, en estos experimentos de titulación de IMiD también se observó una reactivación efectiva de células T a altas concentraciones del fármaco. Por el contrario, el uso de altas concentraciones de fármaco en los conmutadores basados en FKBP12^{F36V}/dTAG-13 da lugar a una reactivación subóptima de la función de las células T. Anteriormente se ha descrito una degradación subóptima de las dianas proteicas en concentraciones elevadas de PROTAC, que se ha atribuido al denominado "efecto gancho" (An et al., EBioMedicine. 2018 Oct; 36:553-562), en el que los dímeros E3 ligasa-PROTAC y PROTAC-proteína diana (tal como FKBP12^{F36V}) dominan sobre el trímero previsto E3-ligasa-PROTAC-proteína diana. La ausencia de un efecto gancho perceptible en las combinaciones dedo de zinc/IMiD facilita el uso clínico de los IMiD, al permitir una reactivación óptima de las células T tanto en la C_{máx} como en la C_{mín}. Por último, el pequeño tamaño de los degrones basados en dedos de zinc (~57 aminoácidos) en comparación con, por ejemplo, el dominio FKBP12^{F36V} (107 aminoácidos) permite el diseño de vectores compactos, incluido el diseño de sistemas de vector único en los que la expresión de CAR/TCR y el conmutador CRASH-IT están vinculados.

Finalmente, comparamos la eficacia de las construcciones Zap70-PD1-dedo de Zinc que contienen el dedo de zinc híbrido ZFP91/IKZF1 con o sin IKZF1 ZF3 (ZF doble y ZF sencillo, respectivamente), o dedos de zinc dobles de tipo silvestre derivados de IKZF1, IKZF3, ZFP91, ZNF276, ZNF653 (Figura 17A). Los resultados muestran que la actividad de las células T que expresan el TCR CDK4 y el degrón ZF doble dedo de zinc híbrido Zap70-PD1-ZFP91/IKZF1 puede restaurarse con mayor eficacia en presencia de los IMiD (Figura 17B-E).

Los polipéptidos quiméricos y el sistema de acuerdo con la invención actual, CRASH-IT, es una plataforma de conmutación de seguridad de células T y células NK titulable y reversible que es agnóstica a la naturaleza del receptor de antígeno activador, como demuestra su uso junto con los TCR restringidos de clase I de afinidad alta e intermedia, los TCR restringidos de clase II y los CAR en el contexto de células T CD4, células T CD8 y células NK.

La naturaleza flexible de CRASH-IT será de valor en entornos en los que es deseable un control fino sobre la sensibilidad de las células T y las células NK. Además, la combinación de CRASH-IT con los CAR existentes no requiere un rediseño estructural de los CAR, y esto es de particular valor para los diseños de CAR que ya han sido evaluados en estudios clínicos.

50 Materiales y métodos

Construcciones retrovirales de ADN

Todas las construcciones de ADN se generaron en la cadena principal del vector de expresión retroviral MP71 (Engels et al., Hum Gene Ther. 2003 Aug 10; 14(12):1155-68). En resumen, las secuencias de ADN con codones optimizados fueron sintetizadas por IDT como fragmentos de genes y clonadas en el vector MP71 mediante ensamblaje de Gibson (Gibson et al., Nat Methods. 2009 May; 6(5):343-5). Para generar el vector MP71-Zap70 2xSH2-cola PD1 IRES-EGFP, se clonaron en MP71 secuencias con codones optimizados que codificaban un fragmento Zap70 humano (P43403, 1-264 aa), un enlazador GGS, el dominio intracelular PD1 humano (Q15116, 192-288 aa), seguido de un codón de parada y un reportero IRES-EGFP.

Se crearon otras construcciones que contenían la cadena principal de MP71 IRES-EGFP a partir de las siguientes secuencias de codificación: MP71 Zap70 - 2 dominios SH2-IRES-EGFP: Zap70 humano (P43403, 1-264 aa), MP71 cola de PD1-IRES-EGFP: secuencia de codificación MV (es decir, el codón de inicio metionina más una valina adicional para generar una secuencia de Kozak), y el dominio intracelular PD1 humano (Q15116, 192-288 aa). MP71-Zap70-PD1-SMASH-IRES-EGFP: Zap70 humano (P43403, 1-264 aa), un enlazador GGS, el dominio intracelular PD1 humano (Q15116, 192-288 aa), un enlazador SGGGS y la etiqueta SMASH de 304 aa (Chung et al., Nat Chem Biol. 2015 Sep; 11(9): 713-20). MP71-Zap70 2xSH2-SMASH-IRES-EGFP: Zap70 humano (P43403, 1-264 aa), un enlazador corto SGGGS y la etiqueta SMASH de 304 aa. Control del vector MP71-IRES-EGFP: el transactivador irrelevante Tet-On 3G de 248 aa (Clontech). MP71-HA-Zap70-PD1-etiqueta SMASH-IRES-EGFP: la secuencia codificadora de la etiqueta HA (MVYPYDVPDYAGSGV) seguida de la secuencia codificadora Zap70-PD1-SMASH. MP71-tuZap70-PD1-SMASH-IRES-EGFP: se añadió ADN que codifica un residuo adicional de alanina después del codón de inicio en MP71-Zap70-PD1-SMASH-IRES-EGFP. MP71-Zap70-PD1-SMASH-delta-IRES-EGFP (carece de la secuencia de deegrón): se eliminó el ADN que codifica los últimos 78 aa de la etiqueta SMASH de la construcción MP71-Zap70-PD1-SMASH-IRES-EGFP. MP71 CD19 ScFv-CD28-CD3 ζ CAR-IRES-huEGFRt: se subclonó un CAR específico de CD19 de segunda generación en la cadena principal MP71 a partir del vector SFG-19-28z (Brentjens et al., Clin Cancer Res. 2007 Sep 15; 13(18 Pt 1): 5426-35) junto con un reportero EGFR humano truncado en IRES (huEGFRt) (Wang et al., 2011) mediante ensamblaje de Gibson. Control del vector MP71-IRES-huEGFRt: el inserto CAR en el vector MP71 CD19 ScFv-CD28-CD3 ζ CAR-IRES-huEGFRt se sustituyó por la secuencia irrelevante de codificación de la proteína transactivadora Tet-On 3G de 248 aa (Clontech). La secuencia codificante del dominio citoplasmático de PD1 (cola de PD1) dentro del vector MP71-Zap70-PD1-SMASH-IRES-EGFP fue sustituida por secuencias de ADN que codifican los dominios citoplasmáticos de BTLA (Q7Z6A9, 179-289 aa), SIRPA (P78324, 395-504 aa), SIGLEC5 (015389, 463 - 551 aa), SIGLEC9 (Q9Y336, 370-463 aa), SIGLEC11 (Q96RL6, 585-698 aa), PECAM1 (P16284-1, 621-738 aa) y LY9 (Q9HBG7, 477-655 aa) para construir realizaciones CRASH-IT que codifiquen los correspondientes dominios citoplasmáticos inhibidores. La secuencia que codifica los dominios 2xSH2 de Zap70 (P43403, 1-264 aa) dentro del vector MP71-Zap70-PD1-SMASH-IRES-EGFP se sustituyó por secuencias de ADN que codifican las secuencias 2xSH2 de Syk (P43405-1, 1-287 aa) o SH4-Unique-SH3-SH2 de Lck (P06239-1, 1-254 aa) para construir las realizaciones CRASH-IT que codifican los dominios SH2 correspondientes. La secuencia que codifica el dominio SMASH dentro del vector MP71-Zap70-PD1-SMASH-IRES-EGFP se sustituyó por la secuencia de ADN que codifica FKBP^{F36V} para construir la realización CRASH-IT que puede controlarse mediante PROTAC dTAG-13 (Nabet et al., Nat Chem Biol. 2018 May; 14(5): 431-441).

Para generar un panel de CAR-T que codifica dominios alternativos que contienen ITAM, la cadena ζ de CD3 en el vector MP71 CD19 ScFv-CD28-CD3 ζ CAR-IRES-huEGFRt se sustituyó con los dominios citoplasmáticos que contienen ITAM de la cadena gamma del receptor de inmunoglobulina FcεRI (FCER1G) (P30273, 45-86 aa), la cadena épsilon de CD3 (P07766, 153-207 aa), o DAP12 (043914, 62-113 aa). Alternativamente, se suprimió la cadena ζ de CD3 para generar una construcción CAR sin dominio que contenga ITAM (control negativo). La secuencia codificadora de ζ de CD28-CD3 en el vector MP71 CD19 ScFv-CD28-CD3 ζ CAR-IRES-huEGFRt se sustituyó por la secuencia de cadena épsilon de CD3 de longitud completa CD3E (P07766, 25-207 aa) para generar MP71 CD19 ScFv-CD3E CAR-IRES-huEGFRt.

Se crearon construcciones que contenían varios degrones de dedo de zinc en el formato MP71 Zap70-PD1-Dedo de zinc IRES-EGFP utilizando la secuencia que contiene el deegrón IKZF1 ZF2-3 (Q13422, 141-197 aa), o la secuencia que contiene el deegrón IKZF3 ZF2-3 (Q9UKT9, 142-198 aa), o la secuencia que contiene el deegrón ZFP91 ZF4-5 (Q96JP5, 396-455 aa), la secuencia que contiene el deegrón ZNF276 ZF4-5 (Q8N554, 520-579 aa), la secuencia que contiene el deegrón ZNF653 ZF4-5 (Q96CK0, 552-611 aa), o la secuencia que contiene el deegrón ZNF692 ZF4-5 (Q9BU19, 413-473 aa). Para el conmutador CRASH-IT que codifica degrones híbridos dedo de zinc, la secuencia de giro beta IKZF1 ZF2 (FQCNCQGASFT) se sustituyó por secuencias de giro beta de ZNF653 ZF4 (LQCEICGYQCR), ZFP91 ZF4 (LQCEICGFTCR), ZNF276 ZF4 (LQCEVCGFQCR) o ZNF827 ZF1 (FQCPCGLVIK). Para el conmutador CRASH-IT que codifica el dedo de zinc híbrido ZFP91/IKZF1 sin IKZF1 ZF3 (ZF sencillo), se eliminó la secuencia que contiene IKZF1 ZF3 (Q13422, 170-197 aa) de la construcción dedo de zinc híbrido Zap70-PD1-ZFP91/IKZF1 (ZF doble).

El TCR CDK4 restringido a HLA clase I (TCR 17, Strønen et al., Science. 2016 Jun 10; 352(6291):1337-41) y el TCR NY-ESO-1 (TCR 1, Linnemann et al., Nat Med. 2013 Nov; 19(11):1534-41) se han descrito previamente. Las secuencias de dominio variable del TCR CMV-pp65 restringido a HLA clase II (van Loenen et al., PLoS One. 2013 May 30; 8(5):e65212) fueron proporcionados amablemente por M.H. Heemskerk (LUMC, NL) y se clonaron en el vector TCR flex MP71 (Linnemann et al., Nat Med. 2013 Nov; 19(11):1534-41).

Líneas celulares y cultivo celular

Las células FLYRD18, T2, MM90904 (amable donación de Marco Donia, Hospital de Herlev, Dinamarca), Mel526 (Strønen et al., Science. 2016 junio 10; 352(6291):1337-41), NKIRTL006 (Kvistborg et al., Oncoimmunology. 2012 Jul 1; 1(4): 409-418), K562, Daudi, Raji y CBH 5477 (amable donación de M.H. Heemskerk) se cultivaron en IMDM (Invitrogen, #21980065), suplementado con un 8% de FCS (Invitrogen, #F7524-500ML) y penicilina-estreptomicina (100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, Sigma-

Aldrich, #11074440001). Las células FLYRD18, MM90904, MeI526 y NKIRTL006 se pasaron cada 2-3 días con tripsina-EDTA (Invitrogen, # 15400054).

5 La línea celular NK humana KHYG-1 (DSMZ, Leibniz, Alemania) se cultivó en RPMI suplementado con 8% de FBS y penicilina-estreptomina (100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina) que contenía 500 UI/ml de IL-2 (Novartis). Todas las líneas celulares se sometieron a pruebas de detección de micoplasmas mediante PCR (Young et al., Nat Protoc. 2010 May; 5(5):929-34) y resultó negativo.

Producción de retrovirus

10 Las partículas retrovirales se produjeron en células de empaquetado FLYRD18. En resumen, se sembraron 700,000 células de empaquetado FLYRD18 por placa de 10 cm un día antes de la transfección. Al día siguiente, se refrescó el medio de cultivo celular con IMDM suplementado con un 8% de FCS sin antibióticos. se mezclaron 25 µl de X-tremeGENE 9 (Roche, #6365809001) con 800 µl de Opti-MEM (Invitrogen, #11058-021) y se incubaron durante 5 minutos. Posteriormente, se añadió la mezcla Optimem-X-tremeGENE 9 sobre 10 µg de ADN plasmídico retroviral disuelto en agua y se incubó durante 15 minutos, y la mezcla de transfección resultante se añadió gota a gota sobre las células de empaquetado. El sobrenadante que contenía retrovirus se recogió 48 horas después de la transfección y se utilizó inmediatamente o se congeló en nitrógeno líquido.

Aislamiento y activación de células T

20 Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de capas leucocitarias de donantes sanos (Sanquin (Ámsterdam, NL) mediante centrifugación de densidad Ficoll-Isopaque (Linnemann et al., Nat Med. 2013 Nov;19(11):1534-41) y se almacenaron congeladas hasta su uso posterior. Para generar poblaciones de células T activadas, las PBMC se descongelaron en PBS que contenía un 5% de FCS, se contaron y se mezclaron con Dynabeads CD3/CD28 (CTS, #40203D) a una relación de 1: 1 de células con respecto a perlas, a una densidad de 10^7 células/ml.

25 Tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en un tambor, se colocó la mezcla en un imán y se retiraron las células no unidas. Posteriormente, las células T unidas a perlas se resuspendieron en RPMI suplementado con un 10% de suero humano (Sigma-Aldrich, #H3667-100ML) y penicilina-estreptomina que contenía 100 UI/ml de IL-2 (Novartis) y 5 ng/ml de IL-15 (PeproTech, #200-15), y se sembraron a una densidad de 0.75×10^6 células/ml.

Transducción por rotación de células T y células NK

30 Se cubrieron placas de cultivo celular de 24 pocillos no tratadas con 10 µg/ml de retronectina (Takara, #T100B) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se retiró la solución de retronectina y se bloquearon los pocillos con 2 % de BSA (Sigma-Aldrich, A9418-500 g) en PBS durante 30 minutos. Las células T activadas (0.25×10^6 células/ml en RPMI/10% de suero humano/penicilina-estreptomina/200 UI/ml de IL-2 y 10 ng/ml de IL-15) o las células NK KHYG-1 (0.25×10^6 células/ml en RPMI/8% de FCS/penicilina-estreptomina/1000 UI/ml de IL-2) se mezclaron con el sobrenadante retroviral en una proporción 1:1 (volumen/volumen) en placas de 24 pocillos recubiertas de retronectina y se centrifugaron a 2,000 RPM durante 90 minutos a temperatura ambiente.

Carga de péptidos

40 Para su uso como dianas de células T, las células T2 y CBH 5477 se cargaron con las concentraciones indicadas de péptido CDK4 mutante restringido HLA-A*02:01 (ALDPHSGHFV), péptido NY-ESO-1 restringido HLA-A*02:01 (SLLMWITQA) o péptido de CMV restringido HLA-DR1 (KYQEFFWDANDIYR) en IMDM durante 1 hora a 37 °C. A continuación, las células se lavaron una vez y se utilizaron en experimentos de cultivo conjunto.

Ensayo de liberación de citocinas y tinción con anticuerpos

45 Las células T y las células NK fueron pretratadas con las concentraciones indicadas de asunaprevir (MedChemExpress, # HY-14434), grazoprevir (MedChemExpress, # HY-15298), dTAG-13 (Tocris, #6605) o control de DMSO en medio para células T (RPMI/10 % de suero humano/penicilina-estreptomina, 100 UI/ml de IL2 y 5 ng/ml de IL15) o medio para células NK (RPMI/8 % de FCS/penicilina-estreptomina, 500 UI/ml de IL2), respectivamente, durante 24 horas antes de los experimentos de cultivo conjunto. Se mezclaron 100,000 células T o células NK y 100,000 de las células tumorales indicadas en medio para células T o células NK suplementado con tapón de golgi (dilución 1:1000, BD, #51-2301KZ) y anti-LAMP1-APC (dilución 1:100, Biolegend, #328620) en presencia de los fármacos indicados o control de DMSO en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 5 horas a 37 °C.

55 Tras la incubación, las células se lavaron una vez con PBS y se tiñeron con colorante IR (Invitrogen, #L34976) a una dilución de 1:400 durante 5 minutos a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron una vez con tampón FACS (PBS más 0.5 % de BSA) y se tiñeron con anti-CD8-PerCP Cy5.5 (dilución 1:20, BD, #341050), anti-CD4

BV711 (dilución 1:50, Biolegend, #317440), TCR-PE constante anti-murino (en experimentos con TCR transducidos, dilución 1:200, BD, #553172) o cetuximab-PE (en experimentos con construcción CAR transducido que contiene reportero EGFR humano truncado, dilución 1:200, R&D Systems, #FAB9577P) durante 20 minutos a 4 °C. A continuación, las células se lavaron una vez con tampón FACS y se fijaron con solución de fijación y permeabilización BD (#51-2090KZ) durante 20 minutos a 4 °C.

Tras la permeabilización, las células se lavaron dos veces con tampón de permeabilización/lavado BD (#51-2091KZ) y se tiñeron con anti-IFN γ -BV421 (dilución 1:100, BD, #564791), anti-IL-2-PE-Cy7 (dilución 1:100, BD, #560707) y anti-TNF α -BV650 (dilución 1:100, Biolegend, #502938) diluidos en tampón de permeabilización/lavado durante 20 min a 4 °C. Las células se lavaron dos veces, se resuspendieron en 100 μ l de tampón FACS y se analizaron en un analizador Fortessa Special Order. Los datos se analizaron con los programas informáticos FlowJo y Prism 7.

De manera similar, las células T se tiñeron intracelularmente con anti-HA-AF647 (dilución 1:200, Cell Signaling Technology, #3444S), y las células tumorales K562, Raji y Daudi se tiñeron en la superficie celular con anti-CD19-PE (dilución 1:200, BD, #345789) o control de isotipo (Biolegend, #400111) como se describió anteriormente.

Clasificación y expansión rápida de células T

El medio de cultivo de las células que expresan Zap70-PD1-FKBP^{F36V} se suplementa con 0.5 μ M de PROTAC dTAG-13 desde un día antes de la clasificación celular hasta 4 días antes del ensayo con ⁵¹Cr. Las células T humanas primarias modificadas con el TCR CDK4 más el conmutador Zap70-PD1-FKBP^{F36V} o el control del vector IRES-EGFP se clasificaron en un Beckman Coulter Moflo Astrios utilizando una boquilla de 80 μ M. Las células se cultivaron en condiciones estándar de cultivo de células T en RPMI/10 % de suero humano/penicilina-estreptomomicina 100 UI/ml de IL-2 y 5 ng/ml de IL-15 durante 7 días.

Después de esto, las células se expandieron utilizando un protocolo de expansión rápida (REP). En resumen, se generó una mezcla de 2×10^8 células alimentadoras procedentes de 3 donantes mediante irradiación a 4,000 rad (Gammacell 40 Exactor) y las células alimentadoras resultantes se mezclaron a continuación con 1×10^6 células T seleccionadas, y con 4.5 μ g de OKT3 (Invitrogen, #16-0037-85), IL-2 (concentración final de 3000 IU/ml) en 150 ml de medio mixto 20/80 para células T (Invitrogen, #041-96658P) suplementado con penicilina-estreptomomicina (100 UI/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomomicina). En el día 6, el medio de cultivo se refresca con 3000 UI/ml de IL-2 que contenía medio y los cultivos se dividieron en 2 cada 3 días con medio que contenía IL-2 (concentración final de 3000 IU/ml). En el día 12, las células se cambiaron a condiciones de cultivo de células T estándar (RPMI/10 % de suero humano/penicilina-estreptomomicina/100 UI/ml de IL-2 y 5 ng/ml de IL-15) durante 3 días, hasta su uso en ensayos con ⁵¹Cr.

Ensayo con ⁵¹Cr

Un día antes del ensayo con ⁵¹Cr, las células T se pretrataron con 0.5 μ M de PROTAC dTAG-13 o DMSO en condiciones estándar de cultivo de células T en RPMI/10 % de suero humano/penicilina-estreptomomicina/100 UI/ml de IL-2 y 5 ng/ml de IL-15. Se resuspendieron 5×10^5 células tumorales en 100 μ l de medio, se mezclaron suavemente con 100 μ Ci⁵¹Cr y se incubaron a 37 °C durante 45 minutos. Paralelamente, se tomaron alícuotas de 100 μ l de diluciones de células T tratadas con dTAG-13 o con el control de DMSO en placas de 96 pocillos. Se utilizaron como controles 100 μ l de medio solo (liberación espontánea) y 100 μ l de solución de Tritón al 1 % (liberación máxima).

Después del marcaje, las células diana se lavaron tres veces con 1 ml de medio. Las células diana marcadas se resuspendieron a razón de 50,000 células/ml, y las células diana se añadieron a las placas de 96 pocillos a razón de 100 μ l por pocillo. Posteriormente, las placas se centrifugaron a 900 rpm durante 2 minutos y se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Tras la incubación, se añadieron 50 μ l de sobrenadante a una Lumaplate-96 (Packard Bioscience, No. 6005164) y, tras secarse durante la noche, se determinaron los recuentos con un TopCount NXT de PerkinElmer. Los valores experimentales se normalizaron utilizando controles de liberación espontánea y máxima.

Habiendo ahora descrito completamente esta invención, será apreciado por aquellos expertos en el arte que la misma puede ser realizada dentro de un amplio rango de parámetros, concentraciones y condiciones equivalentes sin apartarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones y sin experimentación indebida.

La referencia a etapas de métodos conocidos, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales no constituye en modo alguno una admisión de que cualquier aspecto, descripción o realización de la presente invención se divulgue, enseñe o sugiera en la técnica pertinente.

Debe entenderse que la fraseología o terminología contenida en el presente documento es para propósitos de descripción y no de limitación, de tal forma que la terminología o fraseología de la presente especificación debe

ser interpretada por el experto en la materia a la luz de las enseñanzas y guía presentadas en el presente documento, en combinación con el conocimiento de un experto en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Una célula que comprende un polipéptido quimérico, o que comprende un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica dicho polipéptido quimérico, en el que el polipéptido quimérico comprende:
- 5 a) una primera parte que comprende un dominio SH2 de una proteína que se une a un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada (ITAM);
 b) una segunda parte que comprende un dominio de desestabilización regulado por moléculas pequeñas; y
 c) una tercera parte que comprende un motivo conmutador basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM), y/o un motivo inhibitor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM), preferiblemente un ITSM y un ITIM.
- 10 2. La célula de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el dominio de desestabilización regulado por moléculas pequeñas se selecciona del grupo que consiste en
- i) un degrón autoextirpante (SED), en el que el SED comprende una proteasa reprimible, un sitio de escisión afín y una secuencia de degrón;
 15 ii) un dominio de unión a quimeras dirigidas a la proteólisis (Protac) en el que el Protac comprende un grupo de unión a ubiquitina ligasa E3 (E3LB), opcionalmente un enlazador, y un grupo de unión a proteínas que se une al dominio de unión a Protac en el polipéptido quimérico; y
 iii) un dominio de sustrato del polipéptido CRBN capaz de unirse a la proteína CRBN en respuesta a un fármaco, promoviendo así la degradación del polipéptido quimérico mediada por la vía de la ubiquitina.
- 20 3. La célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el ITAM es un ITAM comprendido en un complejo de receptor de células T (TCR) y/o un complejo de receptor de células NK (NKR) y/o un receptor de antígeno quimérico (CAR), preferentemente un ITAM derivado de una cadena zeta de CD3, una cadena epsilon de CD3, una cadena delta de CD3, una cadena gamma de CD3, una cadena gamma del receptor de inmunoglobulina FcεRI y DAP12, y/o en el que la célula comprende además un receptor de células T y/o un receptor de antígeno quimérico (CAR) y/o un receptor de células NK (NKR), preferentemente en el que la célula es una célula T y/o una célula T CAR y/o una célula NK y/o una célula NK CAR.
- 25 4. La célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el dominio SH2 es de una proteína seleccionada del grupo que consiste en Zap70, Syk y Lck, y/o en la que el polipéptido quimérico comprende más de un dominio SH2 de una proteína que se une a un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora fosforilada.
- 30 5. La célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el ITIM y/o ITSM es de una proteína receptora inhibitora, preferentemente de una proteína receptora inmunitaria inhibitora, preferentemente de una proteína seleccionada del grupo que consiste en PD1, BTLA, SIRPalfa, SIGLEC5, SIGLEC9, SIGLEC11, PECAM1 o LY9.
- 35 6. La célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN es una proteína dedo de zinc C2H2 o un fragmento de la misma que es capaz de unirse de forma inducible por fármaco al polipéptido CRBN, y/o en la que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se selecciona del grupo que consiste en IKZF1, IKZF3, ZFN654, ZNF787, ZNF653, ZFP91, ZNF276, ZNF827, o un fragmento del mismo que sea capaz de unirse de forma inducible por fármacos al polipéptido CRBN, preferiblemente en el que dicho fragmento se selecciona del grupo que consiste en IKZF1 ZF2-3 (SEQ ID NO: 41), IKZF3 ZF2-3 (SEQ ID NO: 42), ZFP91 ZF4-5 (SEQ ID NO: 43), ZNF276 ZF4-5 (SEQ ID NO: 44), ZNF653 ZF4-5 (SEQ ID NO: 45), y ZNF692 ZF4-5 (SEQ ID NO: 46) y/o en el que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN comprende un polipéptido de fusión híbrido en el que el polipéptido de fusión híbrido comprende al menos un primer fragmento de una primera proteína dedo de zinc C2H2 y un segundo fragmento de una segunda proteína dedo de zinc C2H2, en el que la combinación de dicho primer fragmento y dicho segundo fragmento en el polipéptido de fusión híbrido es capaz de unirse de forma inducible por fármaco al polipéptido CRBN, preferentemente en el que el polipéptido de fusión híbrido comprendido en el dominio de sustrato del polipéptido CRBN comprende un primer fragmento seleccionado del giro beta de ZFP91 ZF4 (LQCEICGFQCR; SEQ ID NO: 52), ZFN653 ZF4 (LQCEICGYQCR; SEQ ID NO: 53), ZNF276 ZF4 (LQCEVCGFQCR; SEQ ID NO: 54), ZNF827 ZF1 (FQCPICGLVIK; SEQ ID NO: 55) y un segundo fragmento seleccionado de la hélice alfa de IKZF1 ZF2 (QKGNLLRHIKLIH; SEQ ID NO: 56), preferiblemente el polipéptido de fusión híbrido comprende el giro beta de ZFP91 ZF4 y la hélice alfa de IKZF1 ZF2, preferiblemente en el que el polipéptido de fusión híbrido comprende uno seleccionado de la SEQ ID NO: 47-51.
- 45 7. La célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el dominio de unión a sustrato del polipéptido CRBN comprende o comprende además IKZF1 ZF3 (FKCHLCNYACRRRDALTGHLRTH; la SEQ ID NO: 57), preferentemente en el que el dominio de unión a sustrato del polipéptido CRBN comprende el giro beta de ZFP91 ZF4, la hélice alfa de IKZF1 ZF2, e IKZF1 ZF3, y/o en el que el fármaco que permite que el dominio de unión a sustrato del polipéptido CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico,
- 55

es un IMiD, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avandomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885.

8. La célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que

- 5 a) el dominio SH2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 7-11 o comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 12 - 14;
- 10 b) la primera parte del polipéptido quimérico comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 7 - 11 o comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 12 - 14;
- c) el ITAM es YxxL/lx(6-8)YxxL/l;
- 15 d) el dominio SH2 es un dominio SH2 que se une a un ITAM fosforilado comprendido en la SEQ ID NO 1 - 6, o que se une a una secuencia de aminoácidos que tiene un 80% o más de identidad con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 1- 6;
- e) el ITIM es S//V/LxYxxI/V/L, y/o el ITSM es TxYxxV//I;
- f) el ITSM y/o ITIM es un ITSM y/o ITIM que está comprendido en la SEQ ID NO 15-22;
- 20 g) la tercera parte del polipéptido quimérico comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 15-22;
- h) la segunda parte del polipéptido quimérico comprende o consiste en un segundo aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 35 o 40 o la SEQ ID NO: 41 - 57; y/o
- i) el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 80% o más de identidad con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 23 - 34, la SEQ ID NO 36, o la SEQ ID NO 58-68.

25 9. Un polipéptido quimérico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, y/o un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, y/o un vector que comprende dicho ácido nucleico y/o una célula que comprende dicho vector.

30 10. Una composición farmacéutica que comprende la célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, el polipéptido quimérico, el ácido nucleico y/o el vector de la reivindicación 9.

11. Una célula de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 8 para su uso como medicamento, preferentemente para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, preferentemente en el que el tratamiento comprende

- 35 a) administrar al sujeto una población de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8;
- b) opcionalmente, administrar al sujeto un inhibidor de la proteasa reprimible o un Protac que se une al dominio de unión de la quimera dirigida a la proteólisis (Protac) o un fármaco que permita que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avandomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885;
- 40 c) opcionalmente, si se realiza el paso b), aumentar o reducir la concentración del inhibidor de la proteasa reprimible o de un Protac que se une al dominio de unión de la quimera dirigida a la proteólisis (Protac) o del fármaco que permite que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avandomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885.

45 12. Un método para proporcionar una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, en el que el método comprende poner en contacto la célula con un ácido nucleico o el vector de la reivindicación 9, en el que el ácido nucleico o el vector se ponen en contacto con la célula *ex vivo*.

50 13. Un método para controlar la expresión de un polipéptido quimérico en una célula, en el que el método comprende poner en contacto la célula que expresa el polipéptido quimérico de acuerdo con la reivindicación 9 con un inhibidor de la proteasa reprimible, con un Protac que se une al dominio de unión de la quimera dirigida a la proteólisis (Protac), o con el fármaco que permite que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avandomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885, y en el que la célula que expresa el polipéptido quimérico se pone en contacto con el inhibidor *ex vivo*.

55

14. Un método de control de la actividad citotóxica de células T y/o células NK y/o de control de la secreción de citocinas por células T y/o células NK, en el que el método comprende

- a) expresar un polipéptido quimérico de acuerdo con la reivindicación 9 en la célula T y/o la célula NK;
- b) poner en contacto *ex vivo* las células con un inhibidor de la proteasa reprimible, con un Protac que se une al dominio de unión de la quimera dirigida a la proteólisis (Protac) o con un fármaco que permite que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avadomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885;
- 5 c) opcionalmente, aumentar o reducir la concentración del inhibidor de la proteasa reprimible, el Protac, o el fármaco que permite que el dominio del sustrato polipeptídico CRBN se una a la proteína CRBN, promoviendo así la degradación mediada por la vía de la ubiquitina del polipéptido quimérico, preferiblemente en el que el fármaco es un IMiD, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-122 (avadomida), CC-220 (iberdomida) y CC-885.
- 10

Fig. 1

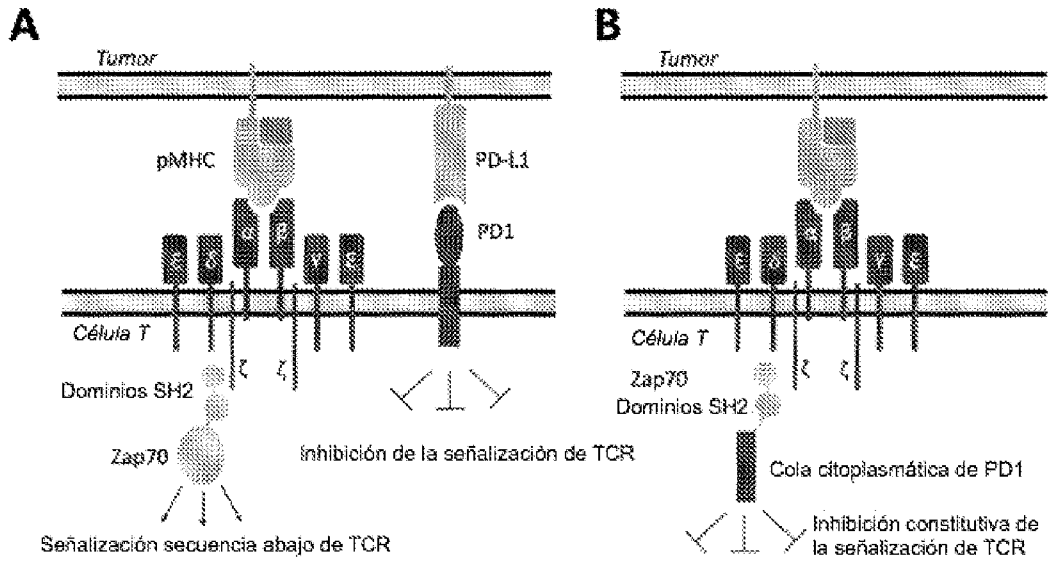


Fig 1. – cont.

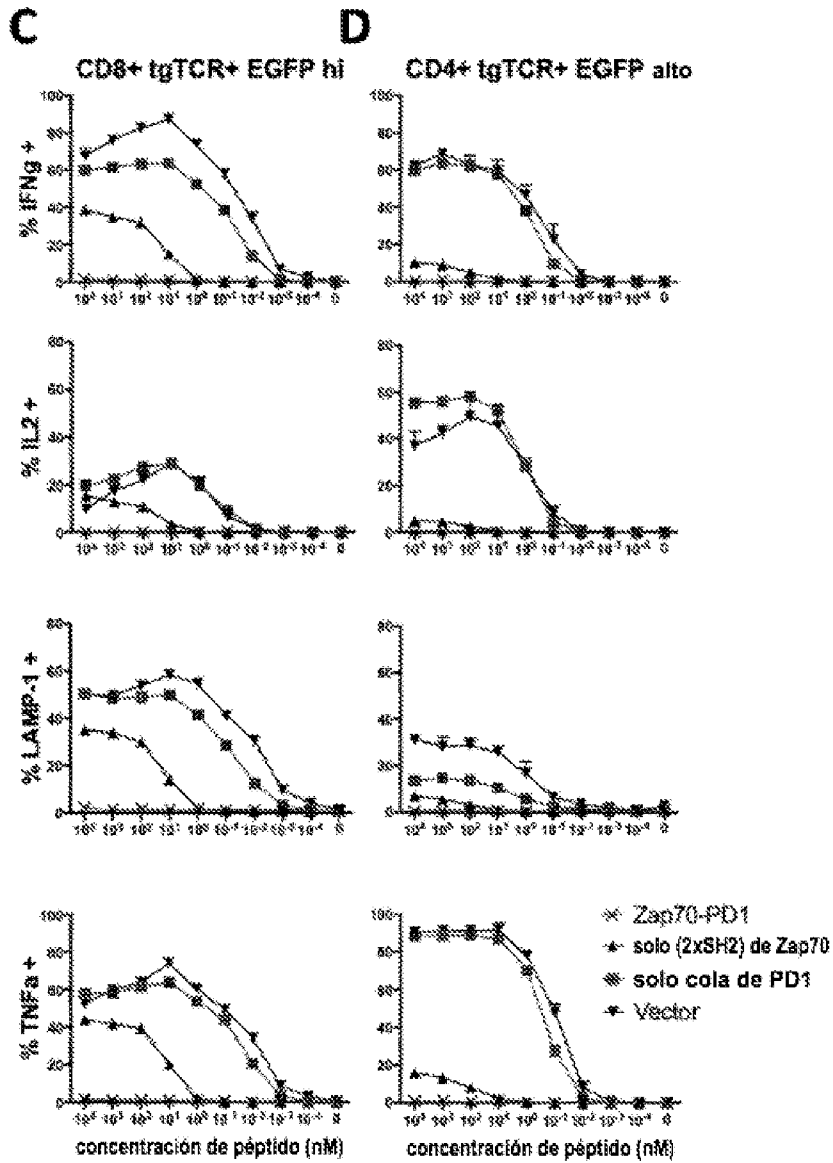


Fig. 2

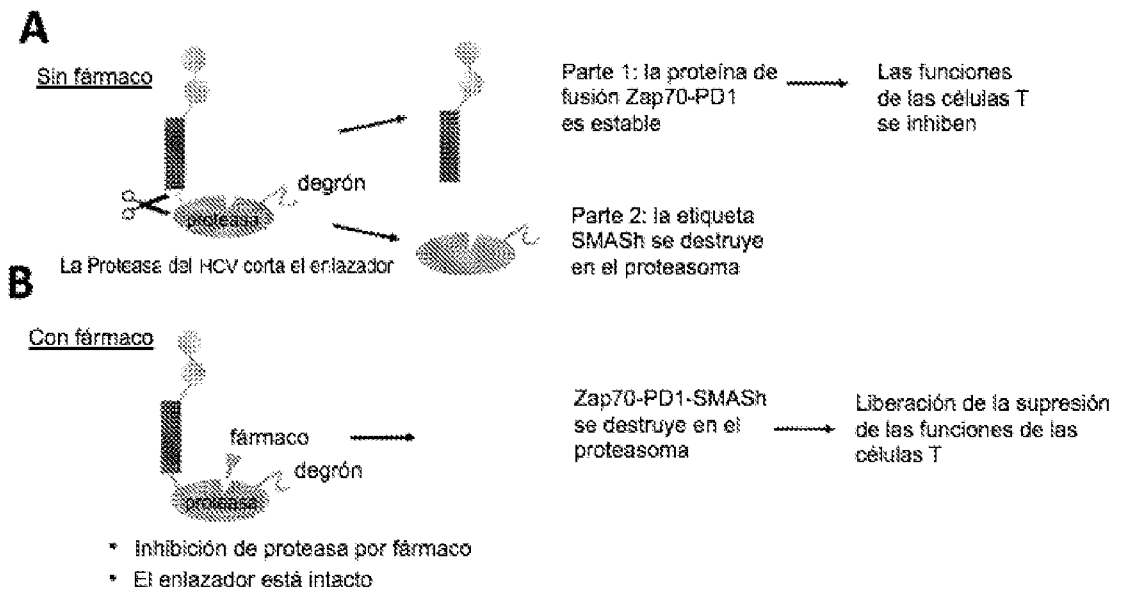


Fig 2. – cont.

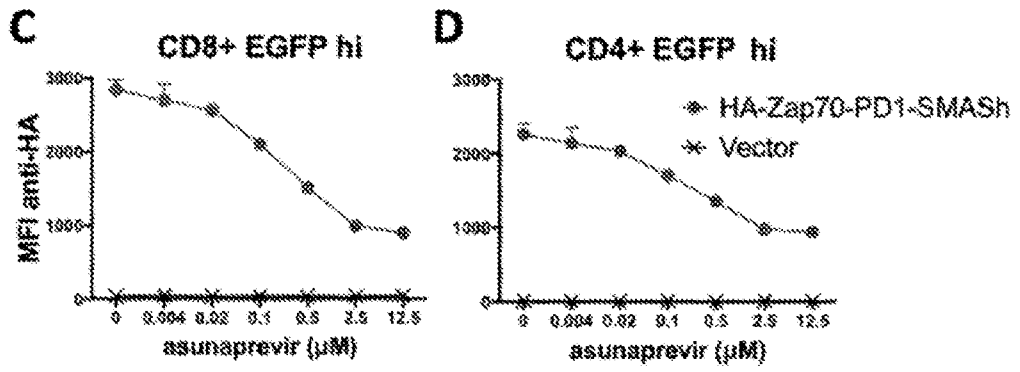


Fig. 2 – cont.

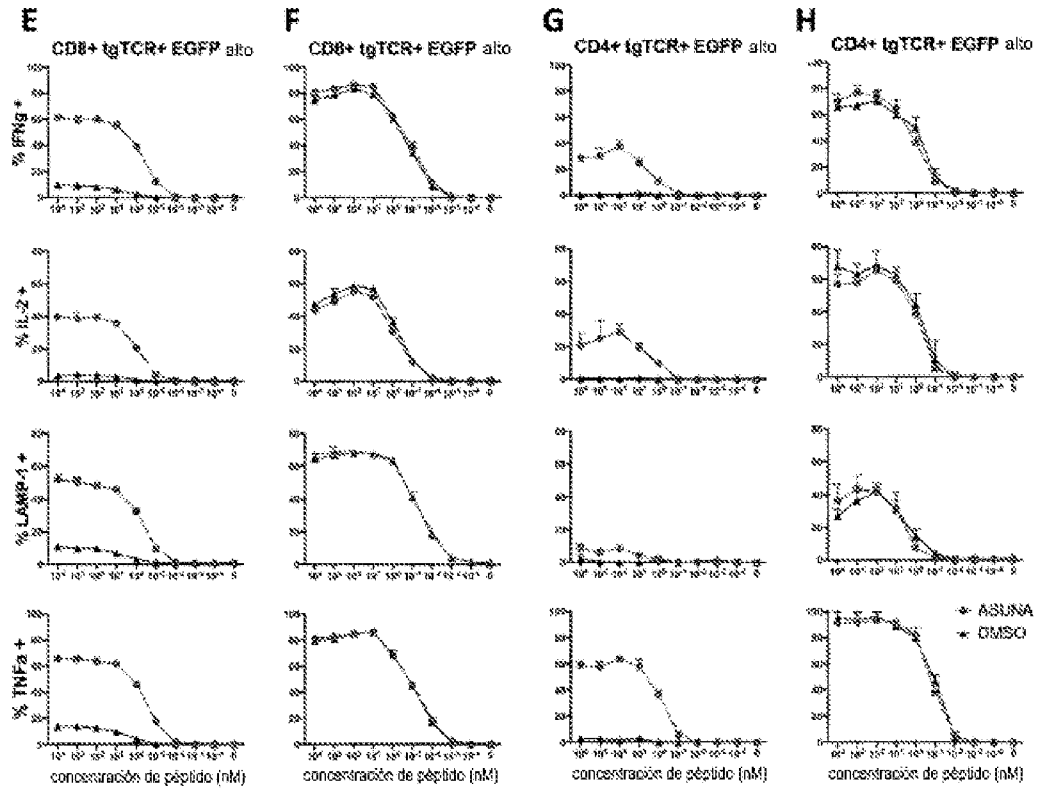


Fig. 3

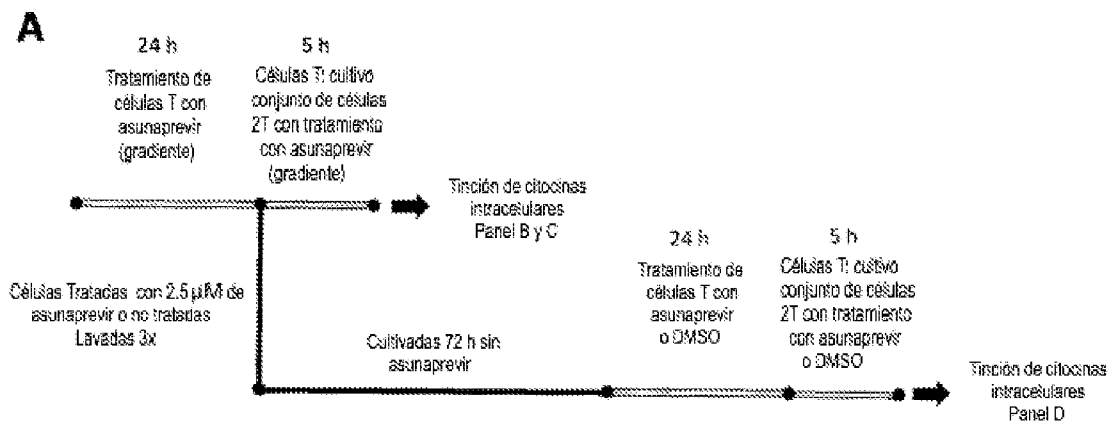


Fig 3. Cont.

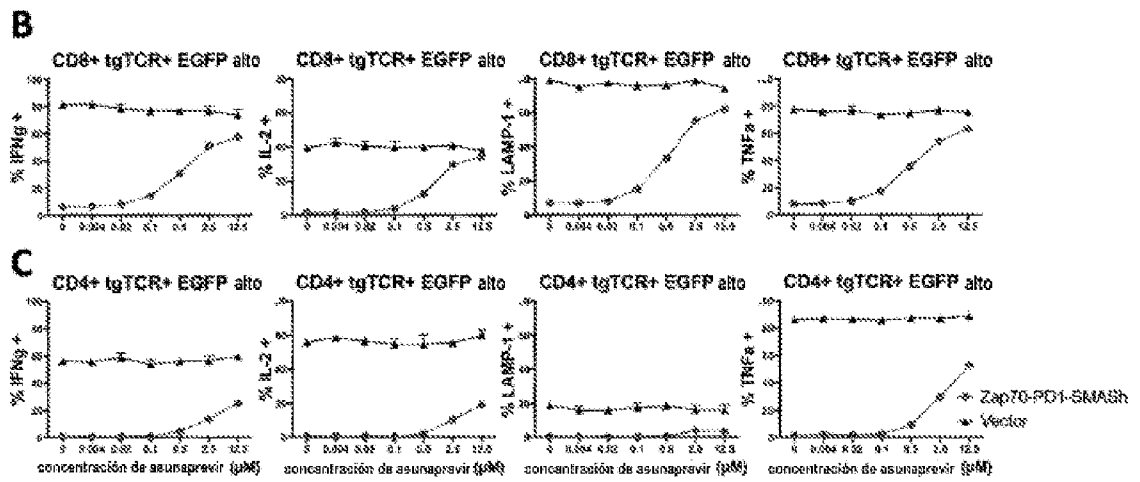


Fig 3. Cont.

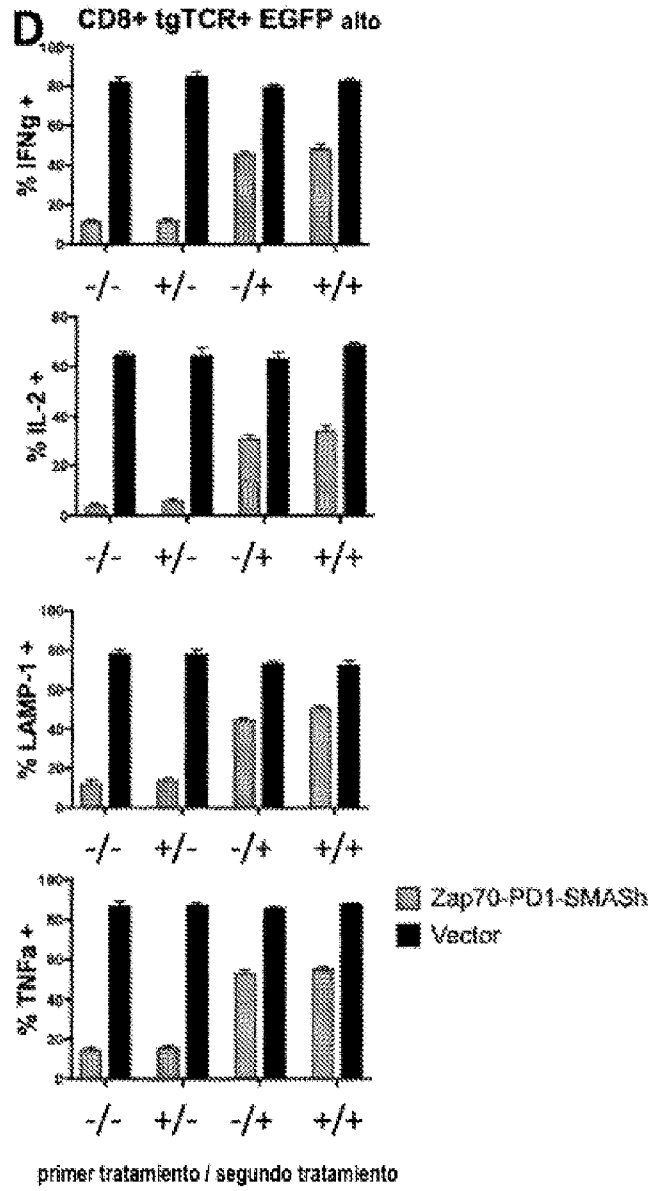


Fig 4.

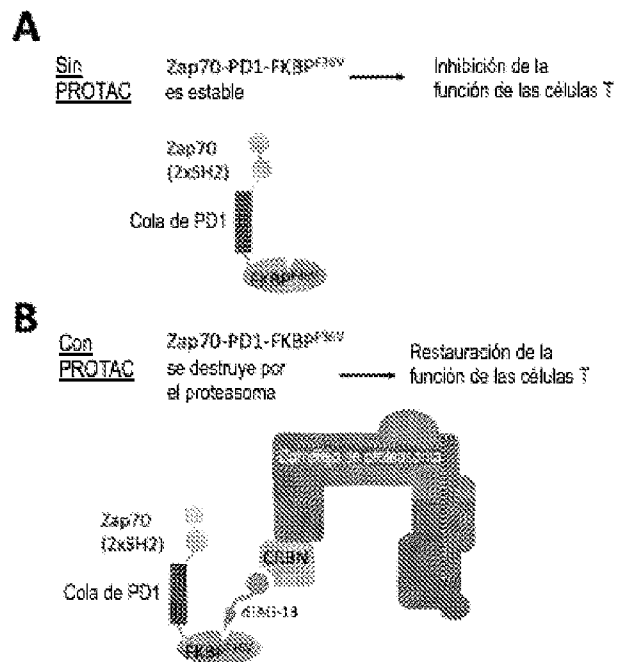


Fig. 4 Cont.

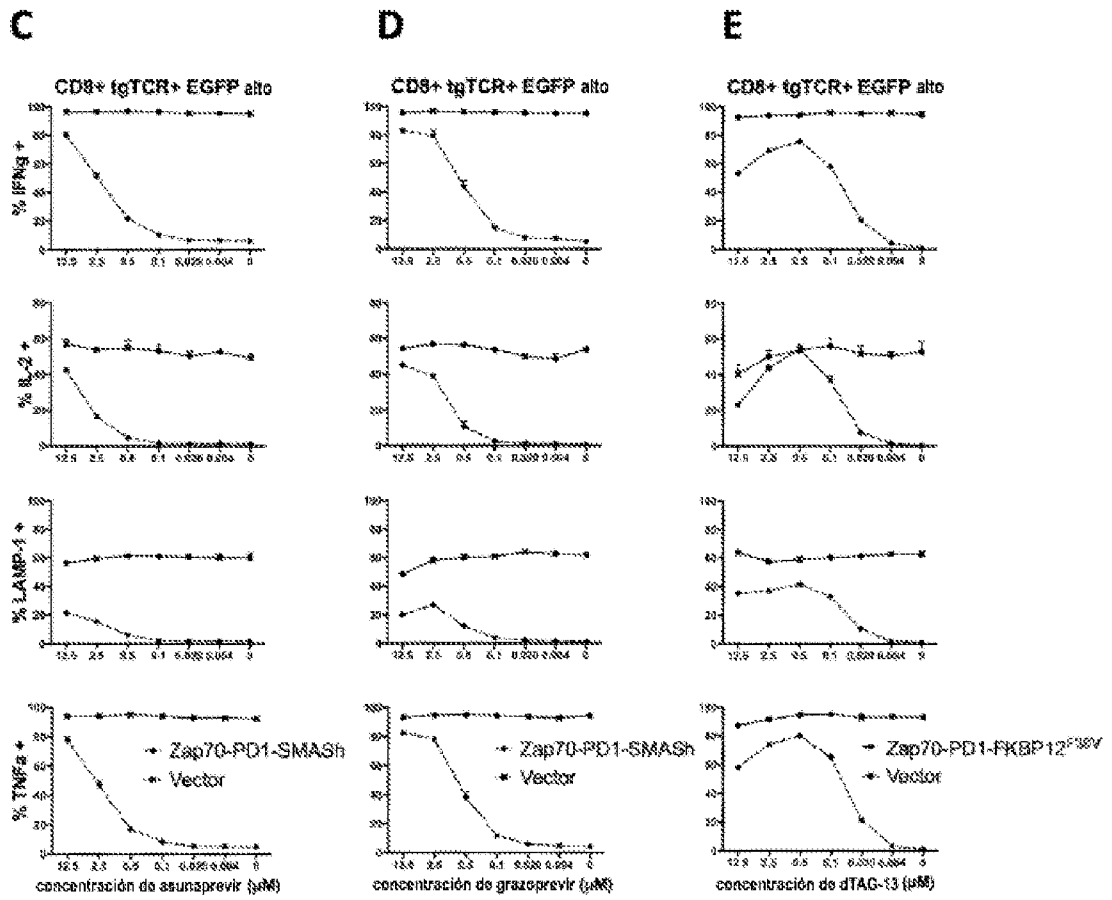


Fig 4. Cont.

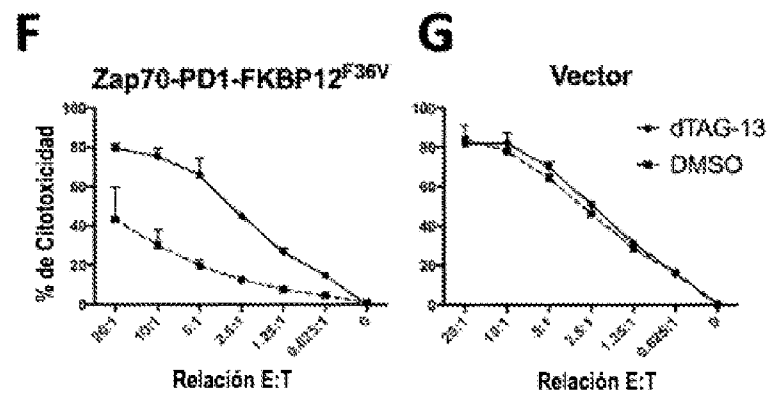


Fig. 5

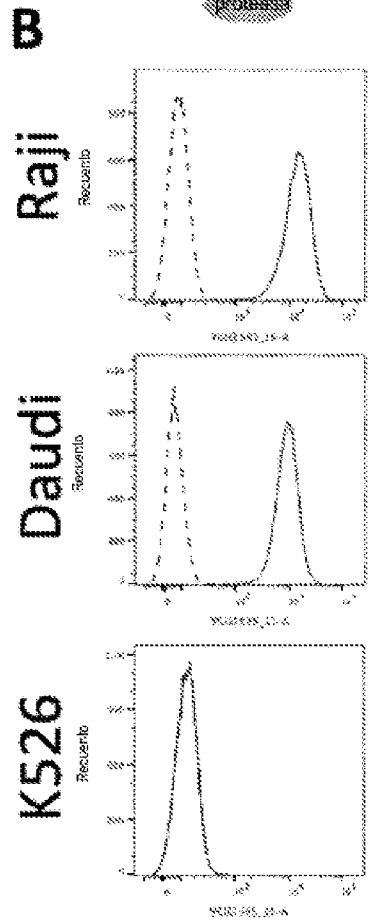
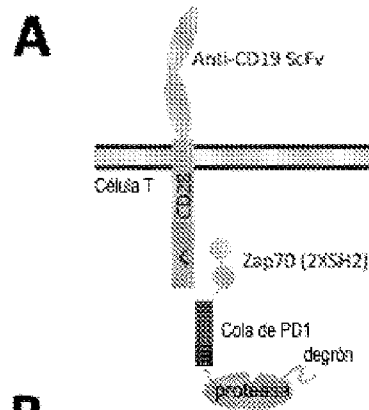


Fig. 5 – Cont.

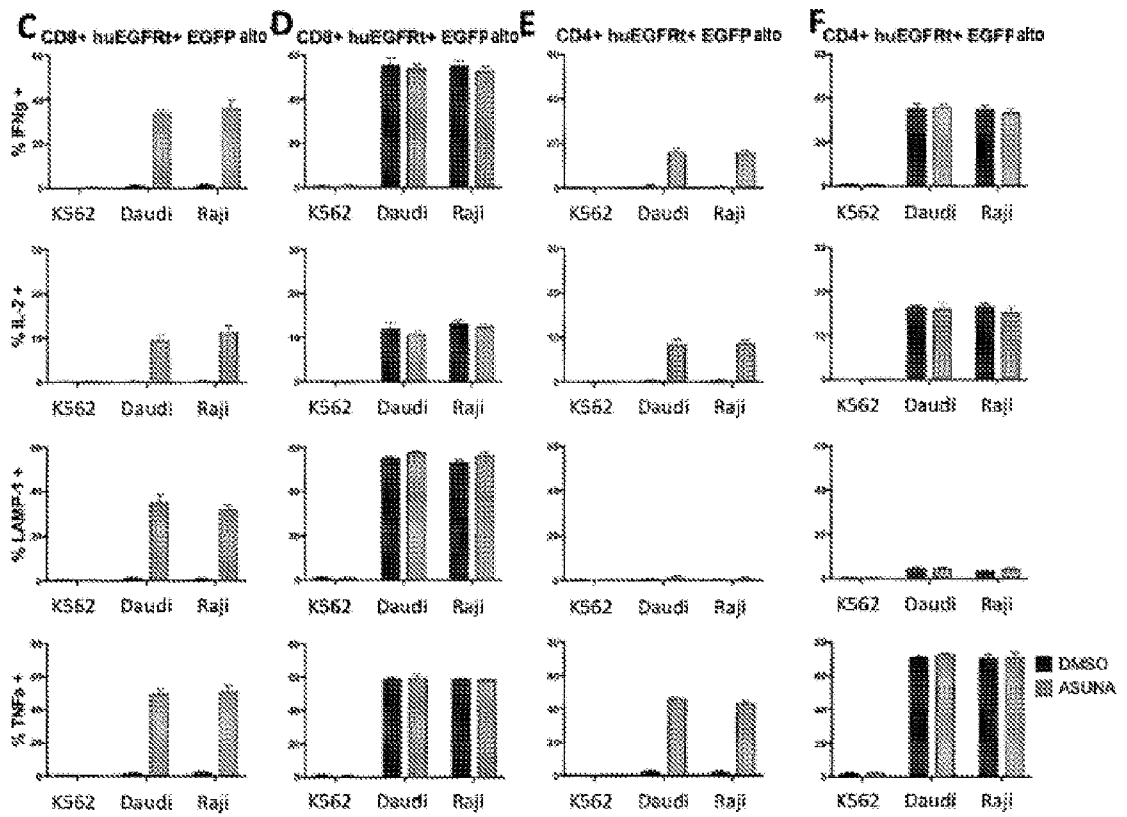


Fig. 6

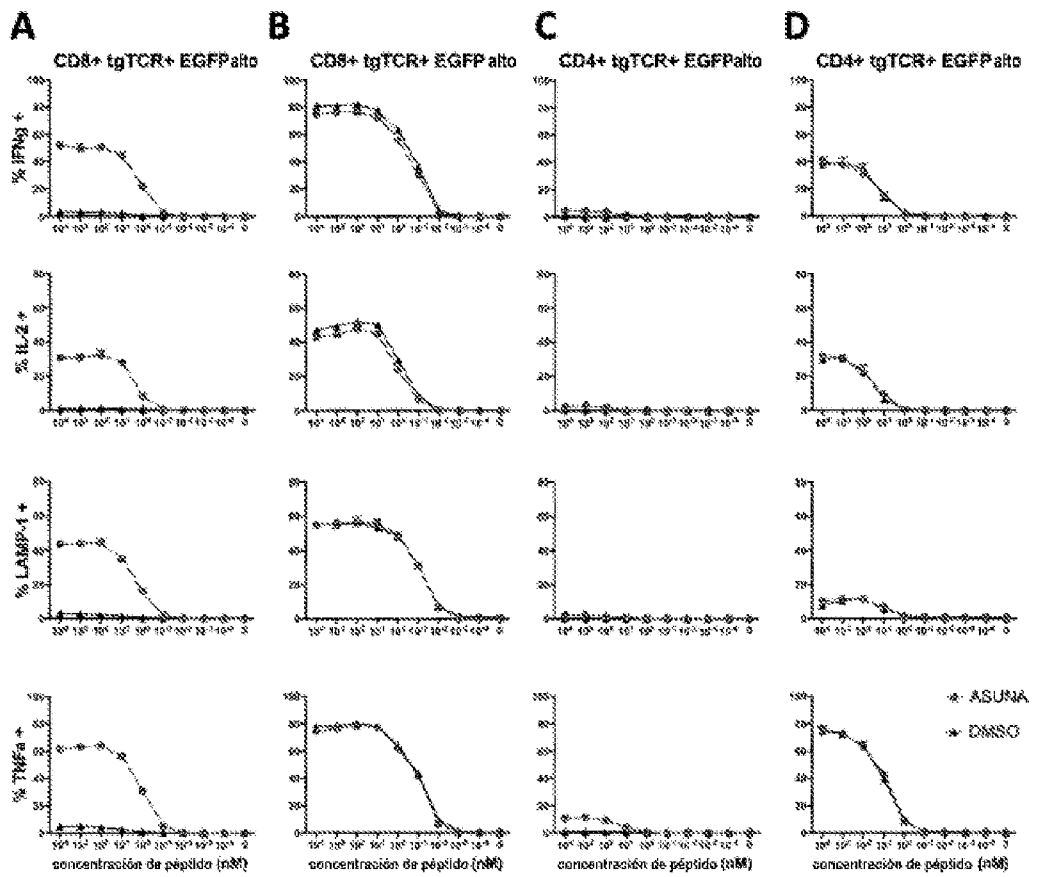


Fig. 7

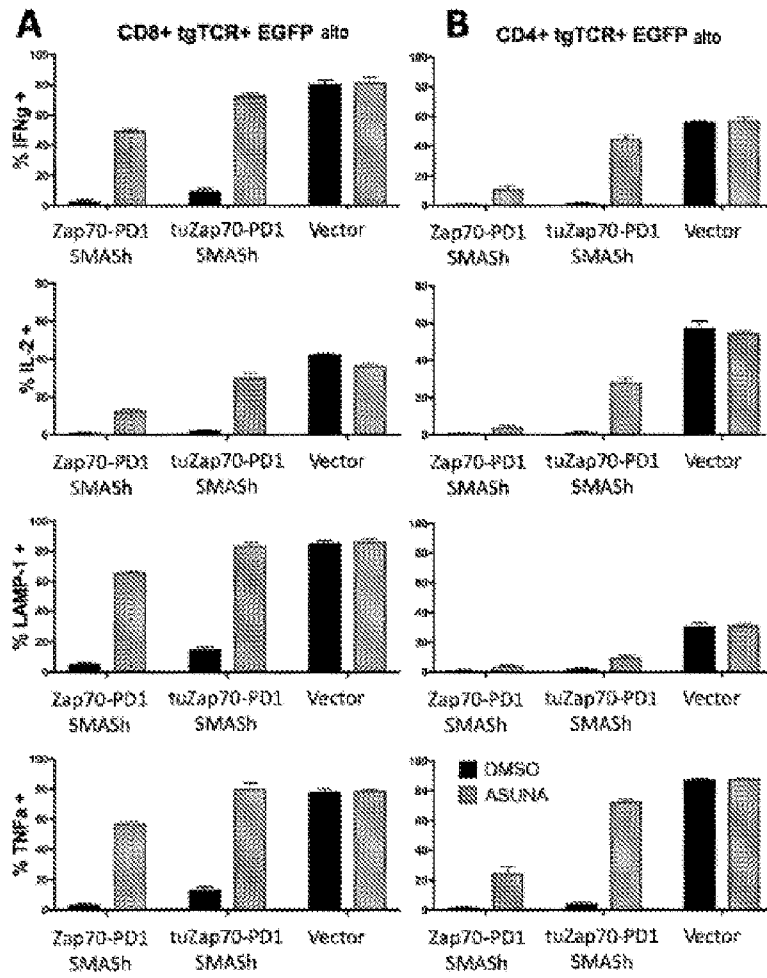
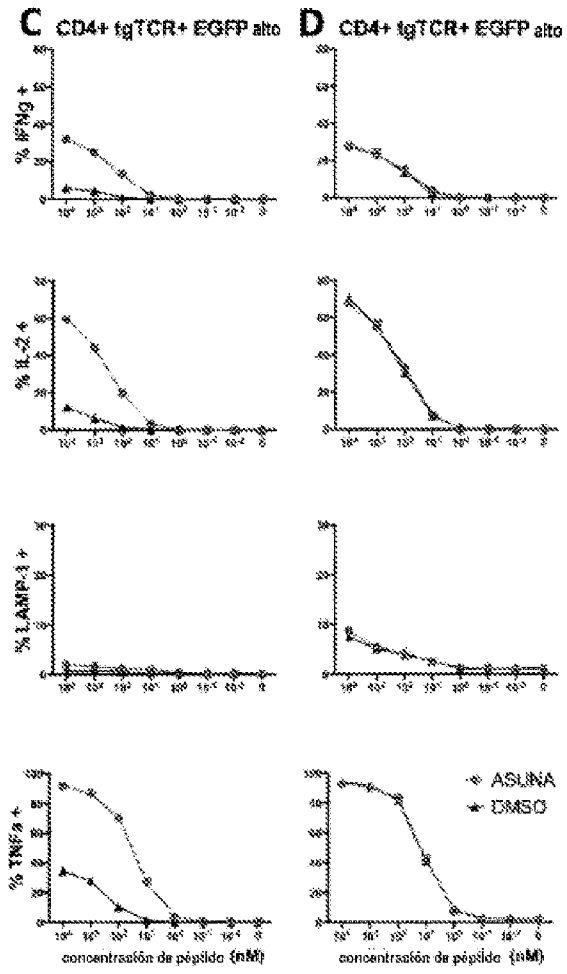


Fig. 7 Cont.



T
C
D

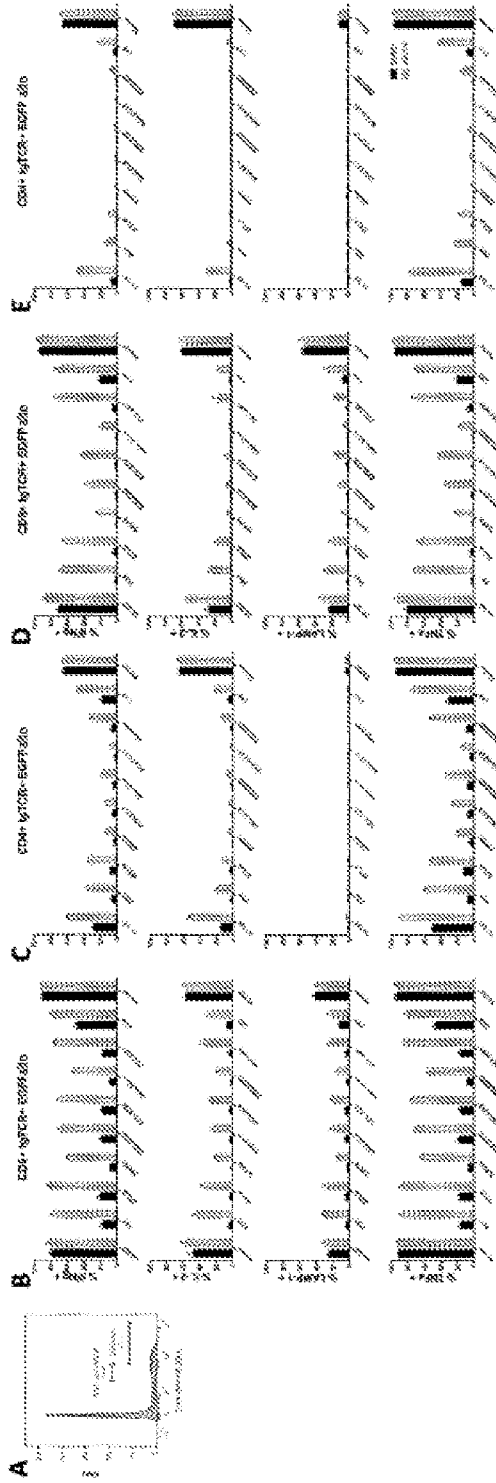


Fig. 9

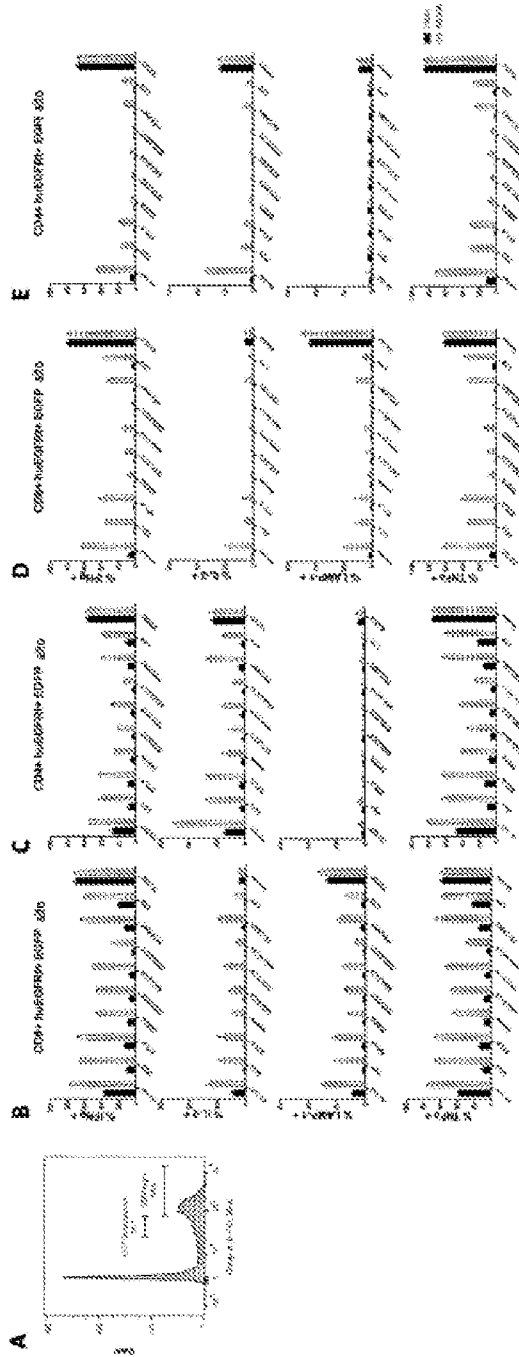


Fig. 10

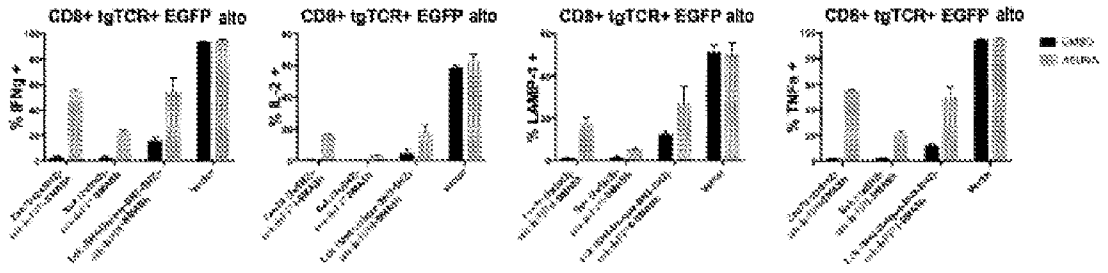


Fig. 12

Secuencia consenso del Motivo de Activación basado en Tirosina Immunoreceptors (ITAM): YxxI/Lx(6-8)YxxI/L

> Dominio citoplasmático de cadena zeta de CD3

RVKFSRSADAPAYQQGQINQL YNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKQRRKNPQEGLYNELOKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMOALPPR

> Dominio citoplasmático de cadena épsilon de CD3

KNBKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPKKEQRDLYSGLNQRRI

> Dominio citoplasmático de cadena delta de CD3

GHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK

> Dominio citoplasmático de cadena gamma de CD3

GQDGVKQSRASDKQTLIPNDQLYQPLKDREDDQYSHLGGNQLRRN

<cadena gamma del dominio citoplasmático del receptor de inmunoglobulina FcγRI

RLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ

> Dominio citoplasmático de DAP12

YPLGRNVPNRGAAEAATRKRITETESPYQELGGQRSDVYSDLNTQRPYK

Fig. 13

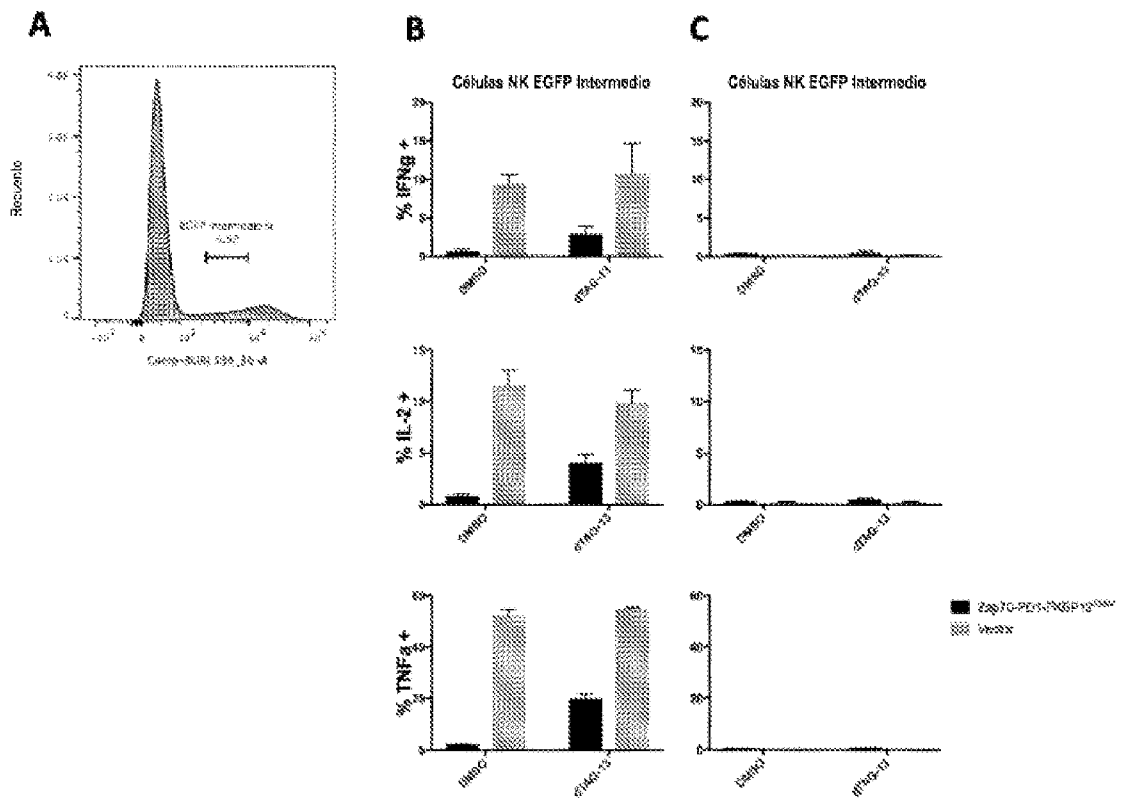


Fig. 14

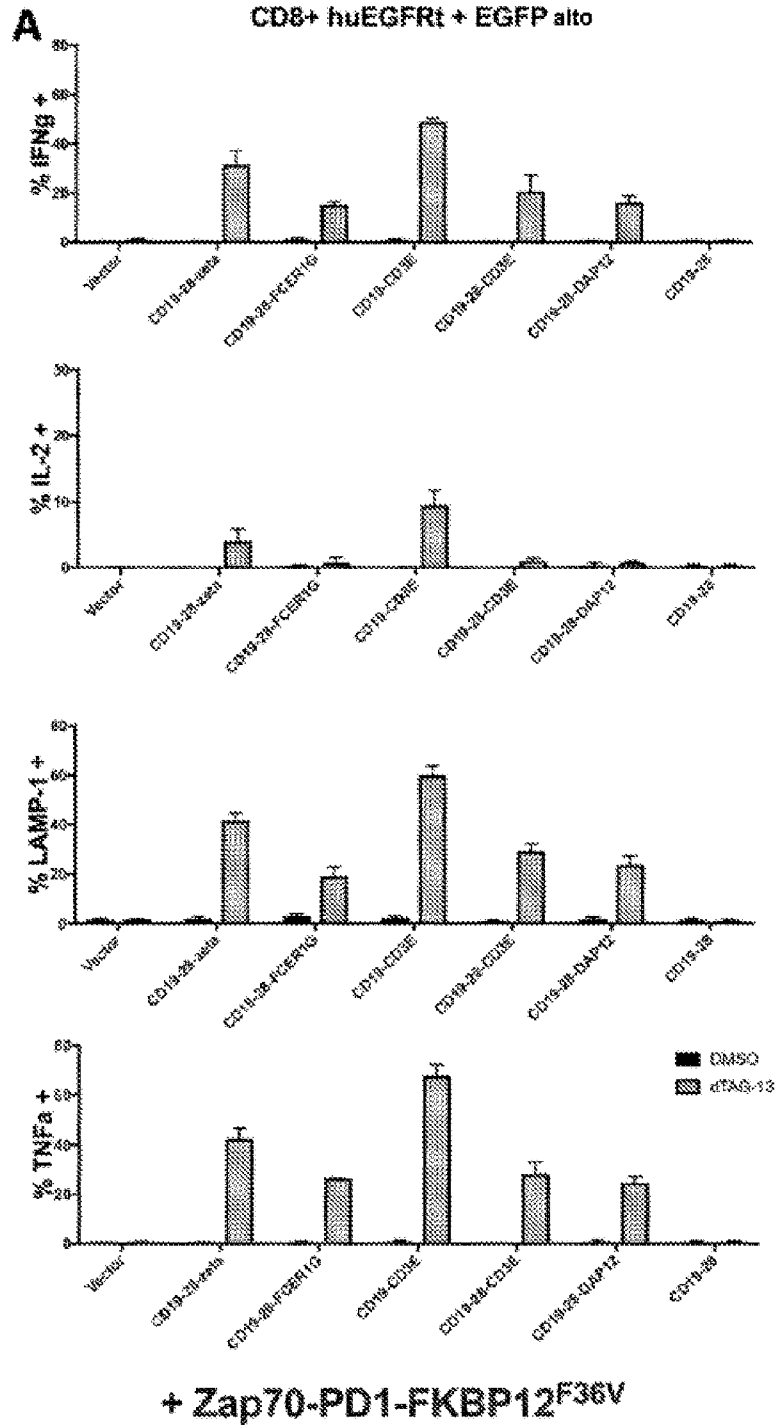
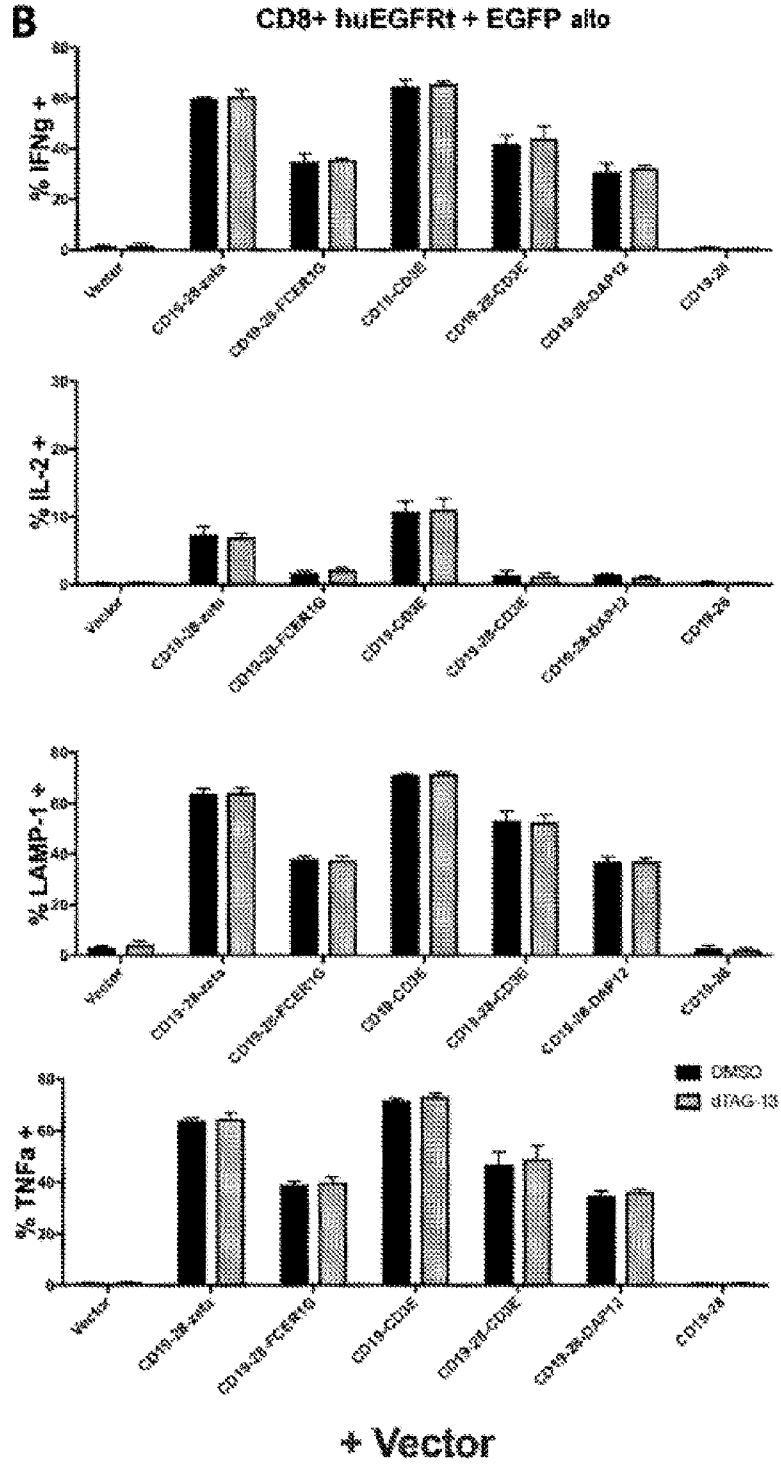


Fig. 14. Cont.



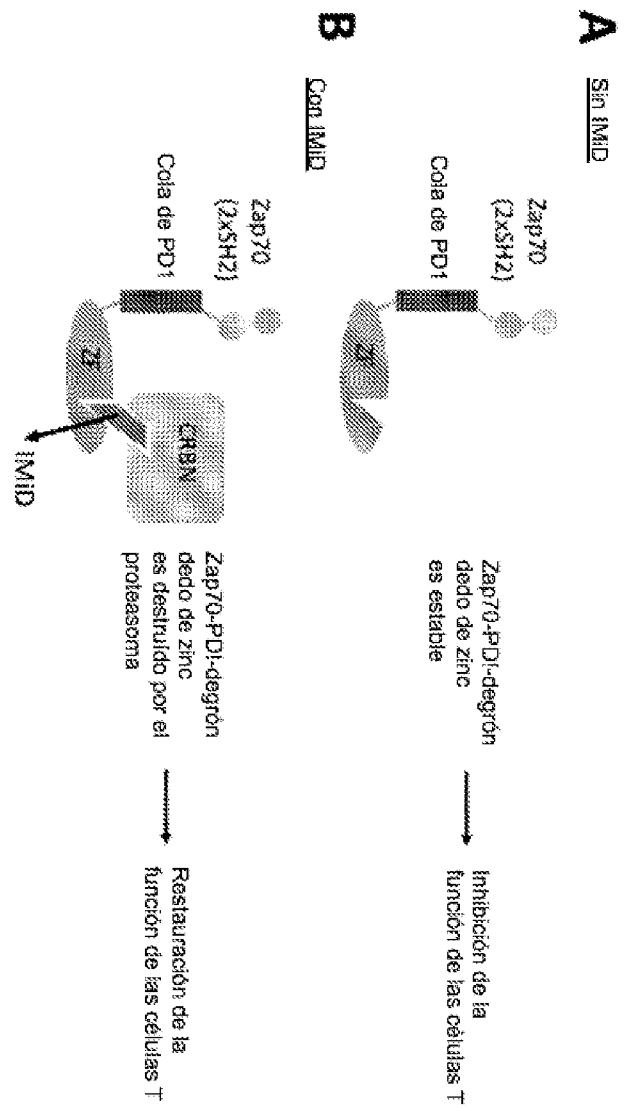


Fig. 15

Fig. 16

A

IKZF1 ZF2-3	<u>FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTH</u>
hibrido ZNF653 / IKZF1	<u>LQCEICGYQCRQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTH</u>
hibrido ZFP91 / IKZF1	<u>LQCEICGFTCRQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTH</u>
hibrido ZNF276 / IKZF1	<u>LQCEVCGFQCRQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTH</u>
hibrido ZNF827 / IKZF1	<u>FQCPICGLVIFQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTH</u>

Fig. 16 Cont.

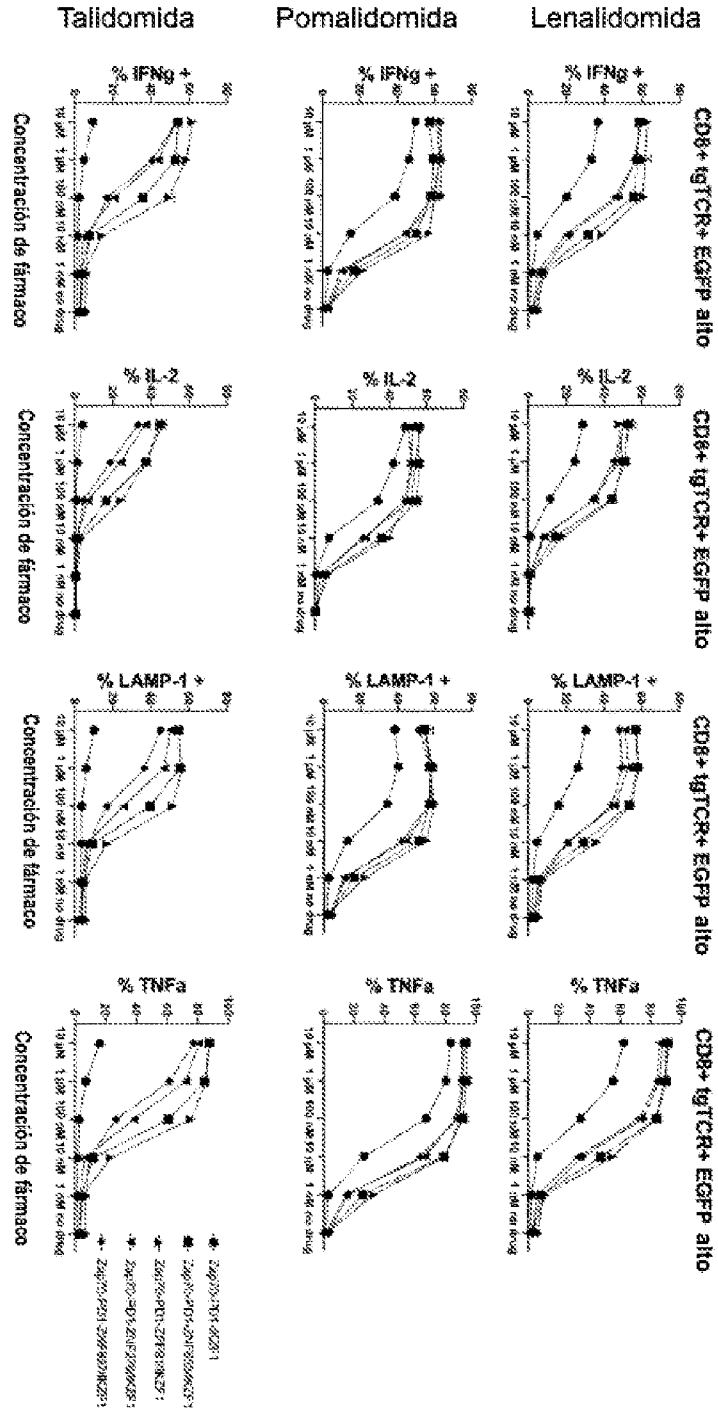
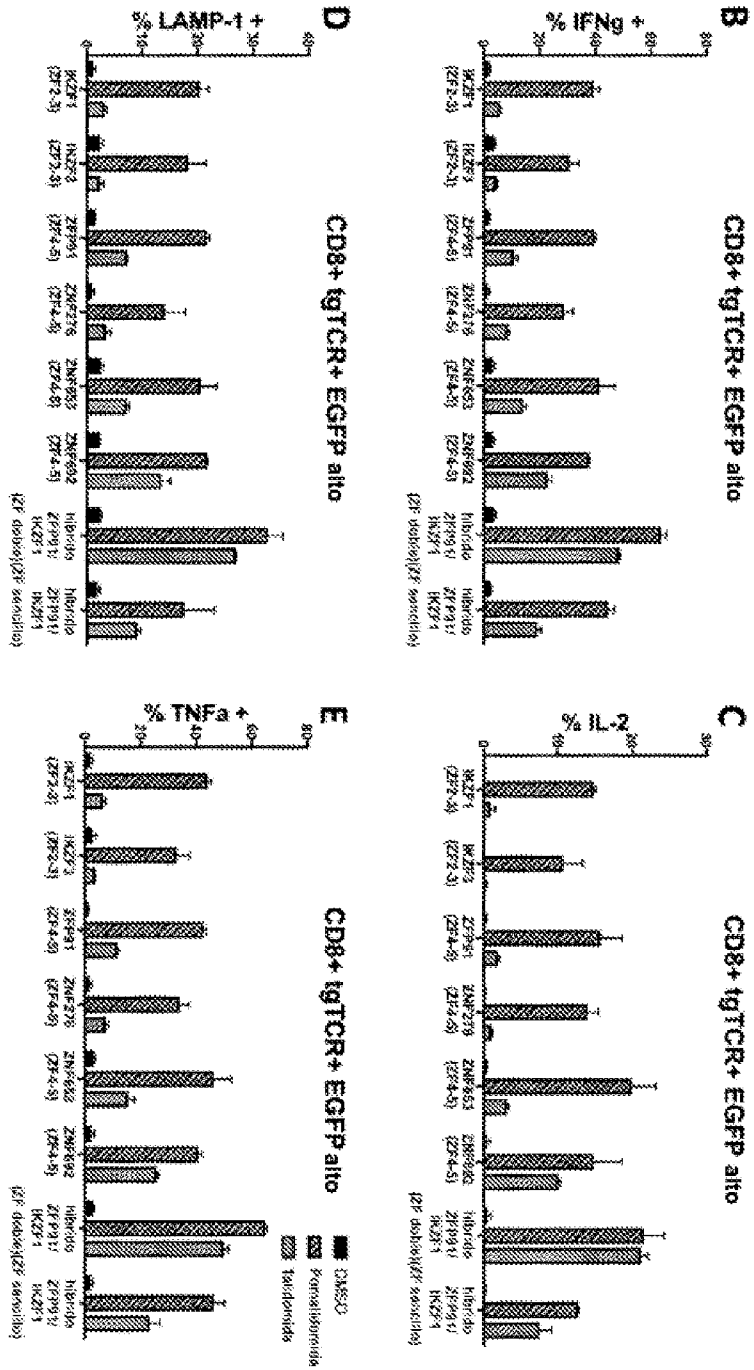


Fig. 17

A		
	IKZF1 ZF2-3	<u>FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLSGEXPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTH</u>
	IKZF3 ZF2-3	<u>FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLSHTGEXPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTH</u>
	ZFP91 ZF4-5	<u>LQCEICGFTCRQKASLNWHMCKHDADSFYQFSCNICGKKFERKDSVVAHKANSH</u>
	ZNF276 ZF4-5	<u>LQCEVCGFQCRQKASLKYBMTKHKAE TELDFACDQCGRRFERAHLNLNVHSMVH</u>
	ZNF653 ZF4-5	<u>LQCEICGYQCNQRASLNWHMCKHTAEVQYNFTCDRCGERFENLDSVKFRTLASH</u>
	ZNF652 ZF4-5	<u>LQCEICGFTCRQKASLNWHQRKHAE TVAALRFPCBFCGKRFEKFDVAHRSKSH</u>
	hibrido ZFP91 / IKZF1 (ZF doble)	<u>LQCEICGFTCRQKGNLLRHIKLSGEXPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTH</u>
	hibrido ZFP91 / IKZF1 (ZF sencillo)	<u>LQCEICGFTCRQKGNLLRHIKLSH</u>

Fig 17. Cont.



// fin