



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **3 018 558**

⑮ Int. Cl.:

A61K 35/17	(2015.01)	C07K 14/725	(2006.01)
C12N 15/12	(2006.01)	C12N 5/0783	(2010.01)
C07K 14/705	(2006.01)	A61K 39/00	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01)		
C12N 15/09	(2006.01)		
C12N 5/00	(2006.01)		
C07K 14/00	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 31/12	(2006.01)		
A61P 31/04	(2006.01)		

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2016 PCT/GB2016/051235**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16174461**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2016 E 16720532 (7)**

⑨ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2025 EP 3288567**

⑮ Título: **Célula T que expresa un receptor de célula T gamma-delta (TCR) y un receptor de antígeno químérico (CAR)**

⑩ Prioridad:

30.04.2015 GB 201507368

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2025

⑯ Titular/es:

UCL BUSINESS LTD (100.00%)
University College London, Gower Street
London WC1E 6BT, GB

⑯ Inventor/es:

ANDERSON, JOHN;
FISHER, JONATHAN;
PULÉ, MARTIN y
GUSTAFSSON, KENTH

⑯ Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 3 018 558 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

Célula T que expresa un receptor de célula T gamma-delta (TCR) y un receptor de antígeno químérico (CAR)

Campo de la invención

La presente invención se refiere a células T inmunoterapéuticas. En particular, la invención proporciona células T gamma-delta inmunoterapéuticas que comprenden un receptor de antígeno químérico (CAR).

Antecedentes de la invención

Los receptores de antígenos químéricos (CAR) desarrollados para la inmunoterapia contra el cáncer combinan un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular con dominios de señalización específicos para las células efectoras en una sola molécula. El sistema CAR más común consiste en un dominio de reconocimiento de antígeno derivado de un anticuerpo monoclonal fusionado con dominios de señalización que proporcionan señales activadoras para las células T.

Normalmente, los dominios de señalización de un CAR proporcionan señales de citotoxicidad, proliferación y supervivencia para activar la célula efectora tras la unión del antígeno al dominio de reconocimiento de antígeno (señales 1 y 2).

15 Drew C Deniger et al.: "Bispecific T-cells Expressing Polyclonal Repertoire of Endogenous [gamma][delta] T-cell Receptors and Introduced CD19-specific Chimeric Antigen Receptor", *Molecular Therapy*, vol. 21, n.º 3, 1 de marzo de 2013, páginas 638-647, analizan la expresión de un receptor de antígeno químérico específico de CD19 en células T gamma delta.

20 Pizzitola Irene et al.: "In vitro Comparison of Three Different Chimeric Receptor-modified Effector T-cell Populations for Leukemia Cell Therapy", *Journal of Immunotherapy*, Lippincott Williams & Wilkins Inc., vol. 34, n.º 6, 1 de julio de 2011, páginas 469-479, analizan la identificación del subtipo efector de células T óptimo para la terapia celular adoptiva con células T modificadas con receptores químéricos.

25 En la publicación internacional WO2014/186469 A2 se analizan los TCR receptores de células T gamma delta y un receptor de antígeno químérico CAR que comprende un dominio transmembrana y un dominio de señalización coestimulador DAP-10.

30 Una limitación de esta tecnología es la posible "toxicidad en la diana-fuera del tumor". Esta toxicidad se debe al reconocimiento de niveles bajos de un antígeno asociado al cáncer, reconocido por un CAR, en tejidos normales. Por ejemplo, GD2 es una diana para el neuroblastoma, pero también se expresa en nervios; y el PSMA es una diana para las células de cáncer de próstata, pero también se encuentra en células normales de riñón, hígado y colon, y astrocitos cerebrales. Este problema es más grave en tumores sólidos, donde existe escasez de dianas altamente selectivas.

Por lo tanto, existe una necesidad de inmunoterapias contra el cáncer que aborden los problemas anteriores.

Sumario de aspectos de la invención

Los autores de la presente invención han determinado un mecanismo para reducir la "toxicidad en la diana-fuera del tumor" usando CAR en células T gamma delta ($\gamma\delta$). En el sistema descrito en el presente documento, se utiliza un CAR para proporcionar una señal coestimuladora (señal 2) a una célula T $\gamma\delta$ tras la unión del antígeno al dominio de reconocimiento de antígeno del CAR. De esta manera, la señal 2 solo se proporciona a la célula T tras la unión del CAR a su antígeno diana (Figura 2A). La señal 1 para la activación de células T $\gamma\delta$ es proporcionada por el TCR endógeno, que es activado por señales de peligro, tales como fosfoantígenos.

40 Una célula T $\gamma\delta$ requiere tanto la señal 1 como la señal 2 para una función efectora óptima. Por lo tanto, en el sistema presente, la célula T $\gamma\delta$ solo estará activada completamente para la citotoxicidad, proliferación y secreción de citocinas si la célula diana: (i) expresa el antígeno reconocido por el CAR; y (ii) expresa señales de peligro reconocidas por el TCR $\gamma\delta$ endógeno.

45 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una célula T que expresa un receptor de células T gamma-delta (TCR) y un receptor de antígeno químérico (CAR), en donde el TCR se usa para proporcionar una señal 1 para la activación de las células T $\gamma\delta$ y el CAR se usa para proporcionar una señal coestimuladora 2, en donde el CAR comprende:

50 (i) un dominio de unión al antígeno;

(ii) un dominio transmembrana; y

(iii) un dominio de señalización intracelular coestimulador de un coreceptor de señalización de células T que, al unirse el antígeno al dominio de unión al antígeno del CAR, proporciona una señal coestimuladora y transmite la señal 2 a la célula T gamma delta y no transmite la señal 1 a la célula T gamma delta tras la unión del antígeno diana;

el TCR gamma delta y el CAR dispuestos de tal manera que el TCR gamma delta proporciona la señal 1 y el CAR proporciona la señal 2 tras unirse a cada receptor respectivamente, en donde la célula T gamma delta solo estará completamente activada y será capaz de destruir una célula diana que exprese un primer antígeno capaz de unirse al TCR gamma delta y un segundo antígeno que sea capaz de unirse al CAR; y

- 5 en donde el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización DAP10;
- en donde el dominio de unión al antígeno es capaz de unirse a GD2 o CD33;
- en donde el dominio transmembrana comprende un tallo de CD8 o un dominio transmembrana de CD28; y
- en donde el CAR comprende además un dominio espaciador entre el dominio de unión al antígeno y el dominio transmembrana; y
- 10 en donde el dominio espaciador está definido por una región Fc.

Así pues, la unión de un primer antígeno al TCR y/o da como resultado la producción de la señal 1 y la unión de un segundo antígeno al dominio de unión al antígeno del CAR da como resultado la producción de la señal 2.

Se describe en el presente documento por referencia, que el dominio de unión al antígeno puede ser capaz de unirse a un antígeno asociado a un tumor (TAA), CD19 o EGFR.

- 15 El dominio de unión al antígeno es capaz de unirse a GD2 o CD33.

Se describe en el presente documento por referencia, que un dominio de señalización intracelular puede comprender el dominio de señalización de CD28, CD27, 41BB, OX40, CD30, IL2-R, IL7-R, IL21-R, NKp30, NKp44 o DNAM-1 (CD226).

El dominio transmembrana del CAR comprende un tallo de CD8 o un dominio transmembrana de CD28.

- 20 El dominio de señalización intracelular del CAR comprende el dominio de señalización de DAP10.

El CAR comprende además un dominio espaciador entre el dominio de unión al antígeno y el dominio transmembrana.

- 25 El TCR y/o puede ser capaz de unirse a un complejo fosfoantígeno/butirofilina 3A1; cadena A relacionada con el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MICA); cadena B relacionada con el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MICB); ligando 1-6 de NKG2D (ULBP 1-6); CD1c; CD1d; receptor de proteína C endotelial (EPCR); lipohexapeptidos; hicoeritrina o histidil-ARNT-sintasa.

El CAR puede comprender una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

SEQ ID NO: 1 (CAR aCD33-Fc-DAP10)

MAVPTQVLGLLLLWLT DARCDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASEDIYFNLVWYQ
 QKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNY
 PLTFGQGTKLEIKRSGGGSGGGSGGGSGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGG
 SLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEWSSISLNGSTYYRDSVKGRFTISR
 DNAKSTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAAQDAYTGGYFDYWGQQTLTVSSMDPAEPK
 SPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIA RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSL
 PGKKDPKFWV LVVVGGVLACYSLVTVAIFI FWV CARPRRSPA QEDGKVYINMPGR
 G

SEQ ID NO: 2 (CAR aGD2-Fc-DAP10)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGQVQLQESGPGLVKPSQTLSITCTVSGFSLASYNIHWV
 RQPPGKGLEWLGVIWAGGSTNYNSALMSRLTISKDNKNQVFLKMSSLTAADTAVY
 YCAKRSDDYSWFAYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGGSENQMTQSPSSLSA
 SVGDRVTMTCRASSVSSSYLHWYQQKSGKAPKVKWYIYSTSNLASGVPSRFSGSGS
 GTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSGYPITFGQGTKVEIKRSDPAEPKSPDKHTCP
 PCPAPPVAGPSVFLFPPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKF
 WLWVVGVLACYSLLTVAFIIFW/CARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un CAR que comprende: (i) un dominio de unión al antígeno; (ii) un dominio transmembrana; y (iii) un dominio de señalización intracelular; en donde el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular coestimulador de DAP10 pero no comprende un endodomino de CD3; en donde el CAR comprende: un dominio de unión al antígeno capaz de unirse a GD2 o CD33; un dominio transmembrana que comprende un tallo de CD8 o un dominio transmembrana de CD28; y un dominio espaciador entre el dominio de unión al antígeno y el dominio transmembrana, en donde el dominio espaciador está definido por una región Fc.

5 Se describe en el presente documento por referencia, un dominio de señalización intracelular coestimulador que puede seleccionarse de un dominio de señalización de CD28, CD27, 41BB, OX40, CD30, IL2-R, IL7-R, IL21-R, NKp30, NKp44 o DNAM-1 (CD226).

10 También se describe en el presente documento por referencia, un CAR que comprende un dominio de unión al antígeno; un dominio transmembrana; y un dominio de señalización intracelular;

15 en donde el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización de DAP10. El dominio de señalización intracelular puede consistir en o consistir esencialmente en un dominio de señalización de DAP10.

El dominio de señalización intracelular del CAR según el segundo aspecto de la invención no comprende un endodomino de CD3.

El CAR según el segundo aspecto de la invención puede ser un CAR como se define en el primer aspecto de la invención.

20 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR como se define en el segundo aspecto de la presente invención.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico como se define en el tercer aspecto de la invención.

El vector puede ser un vector retroviral, un vector lentiviral o un transposón.

25 En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar una célula según el primer aspecto de la invención, que comprende la etapa de introducir: una secuencia de ácido nucleico según el tercer aspecto de la invención o un vector según el cuarto aspecto de la invención en una célula.

El método puede comprender la etapa de estimular la célula con un agente estimulador de células T gamma delta.

30 El agente estimulador de células T γδ puede seleccionarse, por ejemplo, de pirofosfato de isopentenilo (IPP); análogos de IPP tales como pirofosfato de bromohidrina y pirofosfato de (E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enilo; e inhibidores de la farnesil pirofosfato sintasa (FPPS) tales como aminobisfosfonatos (p. ej., zoledronato o pamidronato).

La célula puede ser de una muestra aislada de un sujeto.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una célula según el primer aspecto de la presente invención.

35 En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica según el sexto aspecto de la invención para usar en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

El método puede comprender la etapa de administrar un agente estimulador de células T γδ al sujeto.

El agente estimulador de células T γδ puede seleccionarse, por ejemplo, de pirofosfato de isopentenilo (IPP); análogos de IPP tales como pirofosfato de bromohidrina y pirofosfato de (E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enilo; e inhibidores de la

farnesil pirofosfato sintasa (FPPS) tales como aminobisfosfonatos (p. ej., zoledronato o pamidronato).

El método puede comprender las siguientes etapas:

(i) aislamiento de una muestra que contiene células de un sujeto;

5 (ii) transducción o transfección de células con: una muestra de ácido nucleico según el tercer aspecto de la presente invención o un vector según el cuarto aspecto de la presente invención; y

(iii) administrar las células de (ii) al sujeto.

En un octavo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica según el sexto aspecto de la presente invención para usar en el tratamiento del cáncer.

10 Se describe en el presente documento por referencia, el uso de una célula según el primer aspecto de la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir una enfermedad.

La enfermedad descrita en el presente documento puede ser cáncer, infección microbiana o infección viral.

15 Por lo tanto, la presente invención proporciona una célula T $\gamma\delta$ que solo es activada completamente, y por lo tanto es capaz de destruir, por una célula diana que expresa un primer antígeno que es capaz de unirse al TCR $\gamma\delta$ endógeno (y así estimular la señal productiva 1) y un segundo antígeno que es capaz de unirse al CAR (y así estimular la señal productiva 2).

Por lo tanto, las células T $\gamma\delta$ de la invención son útiles para reducir los efectos "en la diana-fuera del tumor" indeseados. En particular, una célula normal que expresa niveles bajos de un TAA no activará la célula T $\gamma\delta$ de la invención, ya que no expresará una señal de peligro reconocida por el TCR $\gamma\delta$ endógeno y, por lo tanto, no proporcionará la señal 1, que es necesaria para la activación completa de la célula T $\gamma\delta$.

20 **Descripción de las figuras**

Figura 1 - Diagrama de la señalización necesaria para la activación completa de una célula T $\gamma\delta$, que da como resultado la muerte de la célula diana. A) y B) La señalización a través del TCR $\gamma\delta$ o correceptores por sí sola no produce la activación completa de la célula T $\gamma\delta$. C) Una combinación de la señalización del TCR $\gamma\delta$ y el correceptor produce la activación completa de la célula T $\gamma\delta$.

25 Figura 2 - Diagrama ilustrativo de una célula T $\gamma\delta$ de la presente invención. A) Activación normal de una célula T $\gamma\delta$ por una célula diana. B) El bloqueo de la señal 2 por los ligandos solubles de NKG2D secretados por las células cancerosas impide la activación completa de las células T $\gamma\delta$. C) Activación completa de una célula T $\gamma\delta$ de la presente invención por una célula transformada. D) Las células sanas normales no expresan señales de peligro reconocidas por los receptores de células T $\gamma\delta$ endógenos y no activan completamente las células T $\gamma\delta$ de la presente invención.

30 Figura 3 - Ejemplos de CAR ilustrativos que pueden utilizarse.

Figura 4 - Gráficos de puntos de citometría de flujo representativos para ilustrar la coexpresión de un TCR $\gamma\delta$ (V δ 2) y un CAR GD2-DAP10 (Fc, marcador CD20 y marcador CD34) en una célula T $\gamma\delta$

Figura 5 - Destrucción de líneas celulares GD2+ LAN1 y TC71 por células T $\gamma\delta$ V δ 2 transducidas con el CAR aGD2-Fc-DAP10

35 (A) La destrucción significativa de la línea celular de neuroblastoma GD2+ LAN1 solo se observa cuando se usan células transducidas con CAR y no cuando se usan V δ 2 (NT) no transducidas como efectores. (B) Efecto aditivo del CAR aGD2-Fc-DAP10 cuando se combina con la exposición a ácido zoledrónico 24 h que aumenta la producción de fosfoantígenos, contra la línea celular de sarcoma de Ewing GD2+ TC71. (C) La adición del CAR a las células T $\gamma\delta$, que carecen de la señal 1 proporcionada por el TCR $\gamma\delta$ en respuesta al estrés celular, no tiene efecto sobre la citotoxicidad, a diferencia del efecto del CAR en las células T $\gamma\delta$ V δ 2+. Esto indica que la señal del CAR por sí sola es insuficiente para la activación de las células T. Las barras de error indican el EEM para 3-6 donantes independientes.

40 Figura 6 - Destrucción de la línea celular GD2+ LAN1 y ausencia de destrucción de la línea celular GD2- SKNSH. Las barras de error indican el EEM para 3-6 donantes independientes.

Figura 7 - Conservación de la expresión de CAR después de cocultivo prolongado y expansión específica de GD2

45 (A) El cocultivo se inició 24 días después de la transducción (marcado como D0). Se realizaron análisis seriados de células para detectar la presencia de CAR (eje Y) y TCRV δ 2 (eje X) en presencia de células de neuroblastoma irradiadas GD2+ (LAN1) y GD2- (SK-N-SH). Se muestran datos representativos de 1 de los 3 donantes. (B) La expansión de células V δ 2+ transducidas con aGD2-Fc-DAP10 solo se observó en presencia de células diana GD2+ irradiadas (representación gráfica, n = 3 donantes independientes, las barras de error indican EEM).

50 Figura 8 - La tinción por citometría de flujo para la expresión de CD33 de las líneas celulares de AML (Nomo1, Sh1 y

MV4;11) y de los monocitos recién aislados es equivalente.

Figura 9 - A) Las células V δ 2 transducidas con aCD33-DAP10 preservan los monocitos en ausencia de ZOL, pero las células V δ 2 transducidas con aCD33-CD28z no lo hacen. B) Las células V δ 2 transducidas con aCD33-DAP10 destruyen AML mejor que las células V δ 2 NT, pero preservan los monocitos. Las barras de error indican el EEM para 5 donantes independientes.

Figura 10 - Secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de un CAR anti-GD2-Fc-DAP10

Figura 11 - Secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de un CAR anti-CD33-Fc-DAP10

Figura 12 - Las células V δ 2 transducidas con aCD33-DAP10 preservan las células madre hematopoyéticas, pero las células V δ 2 transducidas con aCD33-CD28z no lo hacen. Se cultivó médula ósea humana normal durante la noche 10 con las células T CAR indicadas. Las células madre hematopoyéticas supervivientes se analizaron mediante formación de colonias mieloides en agar blando. Los datos se obtuvieron utilizando células V δ 2 transducidas de tres donantes independientes.

Figura 13 - El entrecruzamiento diferencial del CAR de "solo coestimulación" y el TCR V γ 9V δ 2 conduce a respuestas 15 diferenciales de citocinas. Arriba; Esquema del diseño experimental. Las perlas biotiniladas se recubren con (A) anticuerpos nulos o irrelevantes, o (B) anticuerpos que se unen al TCR (anti-CD3) o al CAR (anti-Ig que se une a la región espaciadora del CAR); C) después del entrecruzamiento, se utiliza la secreción intracelular de citocinas para 20 medir la activación. Como control, se usan perlas estimuladoras anti-CD3/CD28 (Miltenyi). Abajo a la izquierda: gráficos FACS representativos; abajo a la derecha: las respuestas de las citocinas al entrecruzamiento muestran que el entrecruzamiento del CAR de "solo coestimulación" conduce a una respuesta de TNF- α , pero que se requiere una mayor interacción del TCR para una respuesta completa que incluya tanto interferón gamma como TNF- α . Los datos son medias +/- DE de 5 donantes.

Descripción detallada

Célula T γ δ

Las células T se dividen en dos grupos según sus componentes receptores de células T (TCR). El heterodímero del 25 TCR consiste en una cadena α y una β en el 95% de las células T. Estos reconocen antígenos extraños mediante péptidos presentados por moléculas del MHC en las células presentadoras de antígenos y son esenciales para la inmunidad adaptativa.

El 5% de las células T tienen TCR que consisten en cadenas γ y δ . Los TCR γ δ son independientes del MHC y detectan marcadores de estrés celular expresados por tumores.

30 Las células T γ δ reconocen patógenos y células transformadas de una manera sin restricción por HLA. Responden a marcadores de estrés celular (p. ej., fosfoantígenos liberados por células transformadas como subproductos de la ruta biosintética del mevalonato). Las células T γ δ presentan tanto funciones citotóxicas innatas como capacidad de presentación de antígenos, en particular en presencia de células diana opsonizadas por anticuerpos.

35 Las células T γ δ son responsables de la "vigilancia del estrés linfóide", es decir, detectar y responder inmediatamente a infecciones o estrés no microbiano sin necesidad de expansión clonal o diferenciación *de novo*.

La activación de las células T γ δ es regulada mediante un equilibrio entre las señales estimuladoras e inhibidoras. Son 40 activadas por ligandos del TCR γ δ (p. ej., fosfoantígenos) en combinación con ligandos asociados al MHC de la subfamilia K de receptores similares a lectina de células citolíticas de receptores activadores, miembro 1 (KLRK1), también conocido como NKG2D, como la secuencia A relacionada con el polipéptido de clase I del MHC (MICA), MICB y varios miembros de la familia de proteínas de unión a UL16 (ULBP).

Las células γ δ también expresan receptores similares a inmunoglobulinas de células citolíticas (KIR), que pueden ser activadores o inhibidores, incluyendo receptor similar a inmunoglobulina de células citolíticas, de 2 dominios, cola citoplasmática larga, 1 (KIR2DL1) y receptor similar a inmunoglobulina de células citolíticas, de 3 dominios, cola citoplasmática larga, 1 (KIR3DL1).

45 La activación completa de una célula T γ δ que da como resultado la destrucción efectiva de una célula diana requiere la generación de la señal 1 y señal 2 productiva (Figuras 1 y 2A).

Las células T γ δ obtienen la señal 1 de activación de células T de los antígenos de señal de peligro presentes en 50 células transformadas o infectadas. Estos antígenos de señal de peligro son reconocidos a través del TCR γ δ . La señal 2 de activación de células T γ δ también se obtiene normalmente de moléculas de señal de peligro (tales como MICA) presentes en células transformadas o infectadas. La señal 2 puede ser transducida, por ejemplo, a través del receptor NKG2D y DAP 10 (Figura 2A).

Como forma de evitar la detección inmunitaria, las células cancerosas con frecuencia secretan ligandos de NKG2D solubles que bloquean eficazmente la señal 2 en las células T γ δ , impidiendo así su activación y facilitando la infiltración

tumoral (Figura 2B).

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una célula T que expresa un TCR yō y un CAR, en donde el dominio de señalización intracelular del CAR proporciona una señal coestimuladora a la célula T.

Por lo tanto, la disposición del TCR yō y del CAR es tal que el TCR yō proporciona la señal 1 y el CAR proporciona la señal 2 al unirse a cada receptor, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, señal coestimuladora es sinónimo de señal 2, que es necesaria para la activación completa de las células T yō.

Por lo tanto, una célula T yō según el primer aspecto de la presente invención solo estará completamente activada y será capaz de destruir una célula diana que exprese un primer antígeno que sea capaz de unirse al TCR yō (y así estimular la señal productiva 1) y un segundo antígeno que sea capaz de unirse al CAR (y así estimular la señal productiva 2) (Figura 2C).

En ausencia de unión del antígeno al TCR yō, no se genera la señal 1 y no se logra la activación completa de la célula T yō. En otras palabras, en ausencia de unión del antígeno al TCR yō, la célula T yō no es estimulada para destruir la célula diana (Figura 2D).

15 En ausencia de unión del antígeno al CAR, no se genera la señal 2 y no se logra la activación completa de la célula T yō. En otras palabras, en ausencia de unión del antígeno al CAR, la célula T yō no es estimulada para destruir la célula diana.

La célula T yō de la presente invención puede expresar cualquier TCR yō. Se conocen ejemplos de ligandos de TCR yō en la técnica (véase Vantourout, P. y Hayday, A. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 88-100 (2013), por ejemplo).

20 A modo de ejemplo, el TCR yō expresado por una célula de la presente invención puede reconocer fosfoantígenos (p. ej., pirofosfato de isopentenilo (IPP), pirofosfato de bromohidrina (BrHPP) y pirofosfato de (E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enilo (HMBPP)); cadena A relacionada con el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MICA); cadena B relacionada con el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MICB); ligando 1-6 de NKG2D (ULBP 1-6); CD1c; CD1d; receptor de proteína C endotelial (EPCR); lipohexampeptidos; ficoeritrina o histidil-ARNt-sintasa.

25 Una ventaja de la célula de la presente invención es que comprende un CAR que comprende (i) un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno específico y (ii) un endodomino coestimulador particular. Así pues, la célula de la presente invención tendrá una mayor propensión a la activación en un entorno que comprenda un antígeno al que pueda unirse el CAR, ya que la unión del antígeno por el CAR producirá la señalización a través del endodomino coestimulador y la producción de la señal 2. Por ejemplo, si el dominio de unión al antígeno del CAR es específico para un TAA, la célula de la presente invención tendrá una mayor propensión a la activación en un entorno tumoral donde se expresa el TAA debido a la señal coestimuladora proporcionada por el CAR.

30 Receptor de antígeno químérico

La célula T según la presente invención expresa un receptor de antígeno químérico (CAR).

35 Los receptores de antígenos químéricos (CAR) son receptores diseñados que insertan una especificidad arbitraria en una célula efectora inmunitaria. En un CAR clásico, se inserta la especificidad de un anticuerpo monoclonal en una célula T. Los ácidos nucleicos que codifican el CAR pueden transferirse a las células T usando, por ejemplo, vectores retrovirales. De esta manera, se puede generar un gran número de células T específicas del cáncer para la transferencia celular adoptiva. Los estudios clínicos de fase I de este enfoque muestran su eficacia.

40 El dominio de unión al antígeno diana de un CAR se fusiona normalmente por medio de un espaciador y dominio transmembrana, con un endodomino de señalización. Cuando el CAR se une al antígeno diana, esto da como resultado la transmisión una señal activadora al linfocito T en donde se expresa.

45 Los primeros diseños de CAR tenían endodomios derivados de las partes intracelulares de la cadena y de FcεR1 o CD3ζ. Por consiguiente, estos receptores de primera generación transmitían la señal inmunológica 1, que era suficiente para desencadenar la destrucción de células diana cognadas por las células T, pero no lograban activar completamente la proliferación y supervivencia de las células T. Para superar esta limitación, se han construido endodomios compuestos: la fusión de la parte intracelular de una molécula coestimuladora de célula T con la de CD3ζ da como resultado receptores de segunda generación que pueden transmitir una señal activadora y coestimuladora simultáneamente tras el reconocimiento del antígeno. El dominio coestimulador más comúnmente utilizado es el de CD28. Este proporciona la señal coestimuladora más potente, concretamente la señal inmunológica 2, que desencadena la proliferación de células T. También se han descrito algunos receptores que incluyen endodomios de la familia de receptores del TNF, tales como los estrechamente relacionados OX40 y 41BB, que transmiten señales de supervivencia. Ahora se han descrito CAR de tercera generación incluso más potentes que tienen endodomios capaces de transmitir señales de activación, proliferación y supervivencia.

50 La célula T yō de la presente invención comprende un CAR que comprende un endodomino de señalización coestimulador que transmite la señal 2 a la célula T yō tras la unión del antígeno diana.

Los CAR de la célula T de la presente invención pueden comprender un péptido señal de modo que cuando el CAR se expresa dentro de una célula, tal como una célula T, la proteína naciente se dirige al retículo endoplásmico y posteriormente a la superficie celular, donde se expresa.

5 El núcleo del péptido señal puede contener un tramo largo de aminoácidos hidrófobos que tienen tendencia a formar una sola hélice alfa. El péptido señal puede comenzar con un tramo corto de aminoácidos con carga positiva, lo que contribuye a la correcta topología del polipéptido durante la translocación. Al final del péptido señal, típicamente hay un tramo de aminoácidos que la peptidasa señal reconoce y escinde. Esta peptidasa puede escindir durante o después de completarse la translocación para generar un péptido señal libre y una proteína madura. Los péptidos señal libres después son digeridos por proteasas específicas.

10 El péptido señal puede estar en el extremo amino de la molécula.

El péptido señal puede comprender la SEQ ID NO: 6, 7 u 8 o una variante de la misma que tenga 5, 4, 3, 2 o 1 mutaciones de aminoácidos (inserciones, sustituciones o adiciones) con la condición de que el péptido señal todavía funcione para producir la expresión de la superficie celular del CAR.

SEQ ID NO: 6: MGTSLLCWMALCLLGADHADG

15 El péptido señal de SEQ ID NO: 6 es compacto y altamente eficiente. Se prevé que presente aproximadamente 95% de escisión después de la glicina terminal, dando una eliminación eficiente por la peptidasa señal.

SEQ ID NO: 7: MSLPVTLALLPLALLLHAARP

El péptido señal de SEQ ID NO: 7 deriva de la IgG1.

SEQ ID NO: 8: MAVPTQVLGLLLLWLTDARC

20 El péptido señal de SEQ ID NO: 8 deriva de CD8.

Dominio de señalización intracelular coestimulador

El dominio intracelular/endodomnio es la parte de transmisión de señal de un CAR clásico.

25 La célula T γδ de la presente invención comprende un CAR que comprende un endodomnio de señalización coestimulador que transmite la señal 2 a la célula T γδ tras la unión del antígeno diana. Por consiguiente, la célula T γδ de la presente invención comprende un CAR que no transmite la señal 1 a la célula T γδ tras la unión del antígeno diana.

Se sabe que los receptores coestimuladores de células T inducen cambios cualitativos y cuantitativos que reducen los umbrales de activación, previenen la anergia de las células T y mejoran la función de las células T.

Se conocen en la técnica varios correceptores para las células T γδ. La señalización productiva a través de uno o más de estos receptores puede producir la activación completa de la célula T γδ y la destrucción de la célula diana.

30 La célula T γδ de la presente invención comprende un dominio de señalización intracelular de un correceptor de célula T γδ, de modo que la unión del antígeno al dominio de unión al antígeno del CAR genera la señalización de la señal productiva 2 en la célula T γδ.

El dominio de señalización intracelular puede comprender, por ejemplo, el dominio de señalización de DAP10, CD28, CD27, 41BB, OX40, CD30, IL2-R, IL7-R, IL21-R, NKp30, NKp44 o DNAM-1 (CD226).

35 El dominio de señalización intracelular comprende el dominio de señalización de DAP10.

DAP10 es una subunidad de señalización que se asocia con el receptor NKG2D (véase la Figura 1). Es la pareja de unión exclusiva y el intermediario de señalización para NKG2D, y contiene un motivo de activación YxxM que desencadena la cascada de lípidos quinasas.

A continuación se muestra un ejemplo de una secuencia de aminoácidos para un dominio de señalización DAP10:

40 SEQ ID NO: 3 - CARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG

Otros dominios coestimuladores ilustrativos se muestran como SEQ ID NO: 9-19

SEQ ID NO: 9 (endodomnio de CD28)

KRSRLLHSDYMNMTPRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY

SEQ ID NO: 10 (endodomnio de CD27)

45 QRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP

SEQ ID NO: 11 (endodomino de 41BB)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

SEQ ID NO: 12 (endodomino de OX40)

RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

5 SEQ ID NO: 13 (endodomino de CD30)

HRRACRKIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSPRRSSTQLRSGASVTEPVAERGL
MSQPLMETCHSVAAYLESPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIM
KADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVML
SVEEEGKEDPLPTAASGK

SEQ ID NO: 14 (endodomino de IL2-R)

TWQRRQRKSRRTI

SEQ ID NO: 15 (endodomino de IL7-R)

KKRIKPIVWPSLDPDKKTEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEV
FLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACD
APILSSRSRLDCRESGKNGPHVYQDLLLGLTTNSTLPPPFSLQSGILTNPVAQGQ

10 PILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNZ

SEQ ID NO: 16 (endodomino de IL21-R)

SLKTHPLWRLWKKIWAVPSPERFFMPLYKGCSGDFKKWVGAPFTGSSLELGPWSP
EVPSTLEVYSCHPPRSPAQLQLTELQEPALVESDGVPKPSFWPTAQNSGGSAYS
EERDRPYGLVSIDTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDLDAGLEPSPGLEDPLLD
AGTTVLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLLDRLKPPLADGEDWAGGLPWGGRSPGGVS
ESEAGSPLAGLMDTFDSGFVGSDCSSPVECDFTSPGDEGPPRSYLRQWWVIPP
LSSPGPQAS

SEQ ID NO: 17 (endodomino de NKp30)

GSTVYYQGKCLTWKGPRRQLPAVVPAPLPPPCGSSAHLPPVPGG

15 SEQ ID NO: 18 (endodomino de NKp44)

WWGDIWWKTMMEMLRSLDTQKATCHLQQVTDLPWTSVSSPVEREILYHTVARTKISD
DDDEHTL

SEQ ID NO: 19 (endodomino de DNAM-1 (CD226))

NRRRRRERRDLFTESWDTQKAPNNYRSPISTSQPTNQSMDTREDIYVNYPFSRR
PKTRV

20 El dominio de señalización intracelular puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en un dominio de señalización coestimulador como se describe en el presente documento.

El dominio de señalización intracelular puede comprender una secuencia mostrada como SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma. También se describen en el presente documento por referencia, dominios de señalización intracelular que comprenden una secuencia mostrada como SEQ ID NO: 9-19 o una variante de la misma.

25 La variante puede comprender una secuencia que comparte al menos 75% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o 9-19 con la condición de que la secuencia proporcione un dominio de señalización coestimulador eficaz.

La variante puede comprender una secuencia que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o 9-19 con la condición de que la secuencia proporcione un dominio de señalización coestimulador eficaz.

La variante puede comprender una secuencia que comparte al menos 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o 9-19 con la condición de que la secuencia proporcione un dominio de señalización coestimulador eficaz.

La variante puede comprender una secuencia que comparte al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o 9-19 con la condición de que la secuencia proporcione un dominio de señalización coestimulador eficaz.

5 La variante puede comprender una secuencia que comparte al menos 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o 9-19 con la condición de que la secuencia proporcione un dominio de señalización coestimulador eficaz.

La variante puede comprender una secuencia que comparte al menos 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o 9-19 con la condición de que la secuencia proporcione un dominio de señalización coestimulador eficaz.

10 El dominio de señalización intracelular puede comprender una secuencia mostrada como SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma que comparte al menos 75, 80, 85, 90, 95 o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, con la condición de que la secuencia proporcione un dominio de señalización coestimulador eficaz.

El endodomino no comprende el endodomino de CD3. Por ejemplo, el endodomino no comprende la cadena épsilon de CD3, la cadena gamma de CD3 y/o la cadena delta de CD3. En una realización particular, el endodomino no comprende el endodomino de CD3-zeta.

15 Un endodomino de CD3-zeta ilustrativo se muestra como SEQ ID NO: 26.

SEQ ID NO: 26 (endodomino de CD3 zeta)

RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKDKRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR

20 El endodomino de CD3-zeta como se describe en el presente documento puede comprender o consistir en la SEQ ID NO: 26 o una variante de la misma que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 26 y proporciona un dominio transmembrana/dominio intracelular de señalización de células T eficaz.

Dominio de unión al antígeno

25 El dominio de unión al antígeno es la parte del CAR que reconoce al antígeno. Se conocen numerosos dominios de unión al antígeno en la técnica, incluyendo aquellos basados en el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo, miméticos de anticuerpos y receptores de células T. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno puede comprender: un fragmento variable monocatenario (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal; un ligando natural del antígeno diana; un péptido con suficiente afinidad por la diana; un anticuerpo de dominio único; un agente de unión único artificial tal como una Darpin (proteína de repetición de anquirina diseñada); o una cadena simple derivada de un receptor de células T.

30 El dominio de unión al antígeno puede comprender un dominio que no se basa en el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno puede comprender un dominio basado en una proteína/péptido que es un ligando soluble para un receptor de superficie de la célula tumoral (p. ej., un péptido soluble como una citocina o una quimiocina); o un dominio extracelular de un ligando anclado en la membrana o un receptor cuya pareja de unión homóloga se expresa en la célula tumoral.

35 A modo de ejemplo, los ejemplos descritos en el presente documento se refieren a CAR que se unen a GD2 y CD33, respectivamente.

El dominio de unión al antígeno puede basarse en un ligando natural del antígeno.

El dominio de unión al antígeno puede comprender un péptido de afinidad de una biblioteca combinatoria o una proteína/péptido de afinidad diseñado *de novo*.

Antígeno asociado a tumor (TAA)

40 El dominio de unión al antígeno puede unirse a un antígeno asociado a tumor (TAA).

En la técnica se conoce una amplia variedad de TAA y el CAR utilizado puede comprender cualquier dominio de unión al antígeno que sea capaz de unirse específicamente a cualquier TAA.

A modo de ejemplo, el CAR para usar puede ser capaz de unirse específicamente a un TAA indicado en la Tabla 1.

Tabla 1

Antígeno	Tumor de interés
CD20	Linfomas de células B, CLL
CD19	ALL pre-B, linfoma de células B, CLL
CD22	ALL pre-B, linfomas de células B, CLL
CD30	Linfoma de Hodgkin, ALCL
CD52	AML de células T, ALL pre-B
CD70	Linfoma de Hodgkin, DLCL, carcinoma de células renales, glioblastoma EBV+, sarcoma nasofaríngeo indiferenciado
CD33	AML, MDS, APL, CML, JMML, ALL (solo 18%)
CD47	ALL pre-B, ALL de células T, AML
Receptor α de IL7	ALL pre-B, linfomas de células B
TSLPR	ALL pre-B (7%), ALL pre-B en síndrome de Down (60%)
ROR1	ALL pre-B, CLL, linfoma de células del manto
GD2	Neuroblastoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, sarcomas de tejidos blandos, melanoma
IL13Ra2	Glioblastoma, DIPG, melanoma, diversos carcinomas, mesotelioma
VEGFR2	Vasculatura tumoral
HER2	Osteosarcoma, cáncer de colon, cáncer de mama
ALK	Neuroblastoma, tumores neuroectodérmicos, glioblastoma, rhabdomiosarcoma, melanoma
EGFRvIII	Glioma
FGFR4	Rhabdomiosarcoma
B7-H3	Neuroblastoma
Glipicano-3/Glipicano-5	Tumor de Wilms, neuroblastoma, rhabdomiosarcoma, carcinoma hepático, melanoma
FOLR1	Rhabdomiosarcoma, osteosarcoma

Un problema asociado con dirigirse a los TAA en la inmunoterapia contra el cáncer es que pueden expresarse niveles bajos de TAA en tejidos normales. Por ejemplo, GD2 es un TAA del neuroblastoma, pero también se expresa en nervios; PSMA es un TAA del cáncer de próstata, pero también se encuentra en células normales de riñón, hígado y colon, y en astrocitos cerebrales. Este problema es más grave en tumores sólidos, donde hay escasez de dianas altamente selectivas.

La expresión de los TAA en células sanas, normales, puede producir efectos secundarios de tipo "en la diana, fuera del tumor". La presente invención mitiga estos efectos, ya que la célula T γδ de la presente invención solo es activada por células que expresan un ligando tanto para el TCR γδ como para el CAR. Por lo tanto, las células sanas normales que expresan el TAA en niveles bajos no activarán la célula T γδ de la presente invención, porque no expresan un antígeno de señal de peligro capaz de unirse al TCR γδ (Figura 2D).

El dominio de unión al antígeno del CAR es capaz de unirse a GD2 o CD33. Se describe en el presente documento por referencia que el dominio de unión al antígeno de un CAR puede ser capaz de unirse a CD19 o EGFR.

El disialogangliósido (GD2, como se muestra en pubchem: 6450346) es un glucoesfingolípido que contiene ácido siálico expresado principalmente en la superficie celular. La función de este antígeno carbohidrato no se comprende completamente; sin embargo, se cree que desempeña un papel importante en la unión de las células tumorales a las proteínas de la matriz extracelular. El GD2 se expresa de forma densa, homogénea y casi universal en el neuroblastoma. En tejidos normales, la expresión de GD2 se limita principalmente a los melanocitos cutáneos y a las vainas de mielina de las fibras periféricas del dolor. Dentro del SNC, el GD2 parece ser un antígeno embrionario, pero se expresa débilmente en oligodendrocitos dispersos y dentro de la hipófisis posterior.

El dominio de unión al antígeno puede comprender una secuencia mostrada como SEQ ID NO: 20 o una variante de la misma, con la condición de que la variante conserve la capacidad de unirse a GD2.

SEQ ID NO: 20

METDTLLLWVLLWVPGSTGQVQLQESGPGLVKPSQTLSITCTVSGFSLASYNIHWWRQPPG
 KGLEWLGVIWAGGSTNYNSALMSRLTISKDN SKNQVFLKMSSLTAADTAVYYCAKRSDDYS
 WFAYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGSENQMTQSPSSL SASVGDRVTMTCRASSS
 VSSSYLHWYQQKSGKAPVWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQ
 QYSGYPITFGQGKTVEIKRS

El dominio de unión al antígeno puede comprender una secuencia mostrada como SEQ ID NO: 20 o una variante de la misma que comparte al menos 75, 80, 85, 90, 95 o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 20, con la condición de que la variante conserve la capacidad de unirse a GD2.

5 CD33 (como se muestra, por ejemplo, en el número de acceso de Uniprot P20138) es una molécula de adhesión putativa de células de origen mielomonocítico que media la unión a las células dependiente del ácido siálico. Generalmente se considera específico de células mieloides, pero también se puede encontrar en algunas células linfoides.

10 El dominio de unión al antígeno puede comprender una secuencia mostrada como SEQ ID NO: 21 o una variante de la misma, con la condición de que la variante conserve la capacidad de unirse a GD2.

SEQ ID NO: 21

MAVPTQVLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCRASEDIYFNLVWYQQKPGK
 APKLLIYDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGKLE
 IKRSGGGGGGGGGGGGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYG
 MHWIRQAPGKGLEWSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYY
 CAAQDAYTGGYFDYWGQGTLTVSSM

El dominio de unión al antígeno puede comprender una secuencia mostrada como SEQ ID NO: 21 o una variante de la misma que comparte al menos 75, 80, 85, 90, 95 o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 21, siempre 15 que la variante conserve la capacidad de unirse a GD2.

El antígeno CD19 humano es una glicoproteína transmembrana de 95 kd perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (como se muestra por ejemplo en Uniprot P15391). El CD19 se expresa en etapas muy tempranas de la diferenciación de las células B y solo se pierde en la diferenciación terminal de las células B a células plasmáticas. Por consiguiente, el CD19 se expresa en todas las neoplasias malignas de células B, excepto en el mieloma múltiple. 20 El CD19 también se expresa en el compartimento de células B normal.

El EGFR (por ejemplo, como se muestra en el número de acceso de Uniprot P00533) es un receptor de tirosina quinasa que se une a ligandos de la familia EGF y activa diversas cascadas de señalización para convertir señales extracelulares en respuestas celulares apropiadas. Los ligandos conocidos incluyen EGF, TGFA/TGF-alfa, anfiregulina, epigen/EPGN, BTC/betacelulina, epirregulina/EREG y HBEGF/EGF de unión a heparina. El EGFR se expresa en altos niveles en muchas células cancerosas. Sin embargo, también se expresa en células sanas, normales. 25

Dominio de espaciador

Los CAR pueden incluir una secuencia espaciadora para conectar el dominio de unión al antígeno con el dominio transmembrana y separar espacialmente el dominio de unión al antígeno del endodomino. Un espaciador flexible permite que el dominio de unión al antígeno se oriente en diferentes direcciones para facilitar la unión.

30 La secuencia espaciadora puede, por ejemplo, comprender una región Fc de IgG1, una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8 humano o el tallo de CD8 de ratón. Alternativamente, el espaciador puede comprender una secuencia conectora alternativa que tiene longitud y/o propiedades espaciadoras de dominios similares a una región Fc de IgG1, una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8. Un espaciador de IgG1 humana puede modificarse para eliminar los motivos de unión a Fc.

A continuación se dan ejemplos de secuencias de aminoácidos para estos espaciadores:

35 SEQ ID NO: 22 (bisagra-CH₂CH₃ de IgG1 humana)

AEPKSPDKTHCPPCPAPPVAGPSVLFPPKPKDTLMIA RTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTIKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGKKD

SEQ ID NO: 23 (tallo de CD8 humano)

TTTPAPRPPPTAPPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

SEQ ID NO: 24 (bisagra de IgG1 humana)

AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

- 5 El espaciador puede ser una variante de cualquiera de las SEQ ID NO: 22 a 24 que comparte al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 22 a 24 y conserva la actividad funcional de la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 9 a 11.

Dominio transmembrana

- 10 El dominio transmembrana es la secuencia del CAR que atraviesa la membrana.

Un dominio transmembrana puede ser cualquier estructura de proteína que sea termodinámicamente estable en una membrana. Normalmente, se trata de una hélice alfa que comprende varios restos hidrófobos. El dominio transmembrana de cualquier proteína transmembrana puede utilizarse para suministrar la parte transmembrana de la invención. Los expertos en la técnica pueden determinar la presencia y la extensión de un dominio transmembrana de 15 una proteína usando el algoritmo TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). Además, dado que el dominio transmembrana de una proteína es una estructura relativamente simple, es decir, una secuencia polipeptídica que se prevé que forme una hélice alfa hidrófoba de longitud suficiente para atravesar la membrana, también puede utilizarse un dominio TM diseñado artificialmente (el documento US 7052906 B1 describe componentes transmembrana sintéticos).

- 20 El dominio transmembrana puede derivar de cualquier proteína transmembrana tipo I. El dominio transmembrana puede ser una secuencia sintética que se prevé que forme una hélice hidrófoba.

El dominio transmembrana puede derivar de CD28, lo que proporciona una buena estabilidad al receptor.

El dominio transmembrana puede comprender la secuencia que se muestra como SEQ ID NO: 25.

SEQ ID NO: 25 (dominio transmembrana de CD28)

- 25 FWVLVVVGGLACYSLLTVAFIIFWV

Ácido nucleico

La presente invención proporciona además una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR como se describe en el presente documento.

- 30 La secuencia de ácido nucleico puede ser capaz de codificar un CAR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 4 (CAR aCD33-Fc-DAP10)

ATGGCCGTGCCCACTCAGGTCTGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAGATGCC
AGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTTCCCTGTCATGTCGGAA
GATCGCGTCACCATCACCTGTCGAGCAAGTGAGGACATTATTTAATTAGTGT
GGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGGCCCTAAGCTCCTGATCTATGATA
GCTTGGCAGATGGGTCCCCTACCGGTTCACTGGCTCTGGATCTGGCACACAG
TATACTCTAACCATAGTAGCCTGCAACCCGAAGATTGCAACCTATTATTGTC
AACACTATAAGAATTATCCGCTCACGTTGGTCAGGGGACCAAGCTGGAAATCA
AAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAGGAGGCGGAGGCAGCGGAGGCAGGTGGCTC

GGGAGGCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTGCAGTTGGAGTCTGGGGCGGC
TTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTAC
TCTCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGA
GTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCAGTACTATCGAGACTCCGTG
AAGGGCCGATTCACTATCTCAGGGACAATGCAAAAGCACCCCTTACCTCAA
ATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCACAGGA
CGCTTATACGGGAGGTTACTTGATTACTGGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAGT
CTCGTCTATGGATCCCAGCAGCCAAATCTCCTGACAAAACACTCACACATGCC
ACCGTGCCCAGCACCTCCCGTGGCGGCCGTAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTC
AACCCAAGGACACCCCTCATGATCGCCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTCACCGTCTGCACCAAGGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAGCAGGCAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCTGCC
CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCCAGGTCAAGCTGACCTGCCGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAACCG
GAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTCTGGACTCCGACGGCTCCCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTT
CTCATGCTCCGTATGCACTGAGGCCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTCT
GAGTCTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCCAAGTTCTGGGTCTGGTGGTGGTGG
GAGGCGTGTGGCTGGCTGTTACTCTCTCGGTGACCGTGGCTTCATCATCTTCT
GGGTGTGCGCCAGACCACGGGGAGCCAGCCAGGAGGACGGCAAGGTGTA
CATCAACATGCCCGGCCGCGGCTGA

SEQ ID NO: 5 (CAR aGD2-Fc-DAP10)

ATGGAGACCGACACCCCTGCTGCTGGTGCTGCTGCTGGGTGCCAGGCAG
CACCGGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCAGGCCTGGTGAAGGCCAGC
CAGACCCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCTTCAGCCTGGCCAGCTACAA
CATCCACTGGGTGCGGCAGCCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGCTGGCGTG
ATCTGGGCTGGCGGCAGCACCAACTACAACAGCGCCCTGATGAGCGGCTGAC
CATCAGCAAGGACAACAGCAAGAACCCAGGTGTTCTGAAGATGAGCAGCCTGAC
AGCCGCCGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGCGGAGCGACGACTACAGCT
GGTCGCCACTGGGCCAGGGCACCCCTGGTACCGTGAGCTCTGGCGGAGG
CGGCTCTGGCGGAGGCCGCTGGCGGAGGCCAGCGAGAACCAAGATGACC
CAGAGCCCCAGCAGCTTGAGCGCCAGCGTGGCGACCGGGTGACCATGACCT

GCAGAGCCAGCAGCAGCGTGAGCAGCAGCTACCTGCACTGGTACCAGCAGAAG
 AGCGGCAAGGCCCCAAAGGTGTGGATCTACAGCACCAGCAACCTGGCCAGCGG
 CGTCCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGACCTACACCCCTGACC
 ATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAG
 CGGCTACCCCATCACCTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGTGG
 ATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACTCACACATGCCAACCGTGCCCAG
 CACCTCCCCTGGCCGGCCCGTCAGTCTCCTCTCCCCAAAACCCAAGGACA
 CCCTCATGATGCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA
 TAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACACACGTACCGTGTGG
 TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
 TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
 GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCGGGA
 TGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGTTCTATCC
 CAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAACCGGAGAACAACTACA
 AGACCACGCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCCTCTCCTACAGCAAGC
 TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTCTCATGCTCCGTG
 ATGCATGAGGCCCTGCACAATCACTACCCAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCC
 GGCAAGAAGGACCCCAAGTTCTGGTCTGGTGGTGGTGGAGGCGTGCTGG
 CCTGTTACTCTCCTGGTACCGTGGCCTCATCATCTCTGGGTGTGCGCCA
 GACCACGGCGGAGCCCAGGCCAGGAGGACGGCAAGGTGTACATCACATGCC
 CGGCCGCGGCTGA

La secuencia de ácido nucleico puede codificar la misma secuencia de aminoácidos que la codificada por la SEQ ID NO: 1 o 2, pero puede tener una secuencia de ácido nucleico diferente debido a la degeneración del código genético.

5 La secuencia de ácido nucleico puede tener al menos 80, 85, 90, 95, 98 o 99% de identidad con la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, con la condición de que codifique un CAR como se define en el primer aspecto de la invención.

Variante

10 Las comparaciones de secuencias se pueden llevar a cabo visualmente o, más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles comercialmente y de uso público pueden calcular la identidad de secuencia entre dos o más secuencias.

15 La identidad de secuencia puede calcularse a lo largo de secuencias contiguas; es decir, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un resto cada vez. Esto se denomina alineamiento "sin huecos". Normalmente, dichos alineamientos sin huecos se realizan solo a lo largo de un número relativamente corto de restos (por ejemplo, menos de 50 aminoácidos contiguos).

20 Aunque este método es muy simple y consistente, no tiene en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o delección hará que los siguientes restos de aminoácidos no estén alineados, lo que podría dar como resultado una gran reducción del % de homología cuando se realiza un alineamiento global. Por consiguiente, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineamientos óptimos que tengan en cuenta posibles inserciones y delecciones sin penalizar excesivamente la puntuación de homología general. Esto se logra insertando "huecos" en el alineamiento de secuencias para intentar maximizar la homología local.

25 Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones por huecos" a cada hueco que se produce en el alineamiento, de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencias con el menor número de huecos posible, que refleja una mayor relación entre las dos secuencias comparadas, obtendrá una puntuación más alta que uno con muchos huecos. Se usan normalmente los "costes de hueco afín", que cargan un coste relativamente alto por la existencia de un hueco y una penalización menor por cada resto subsiguiente en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más utilizado. Las penalizaciones por huecos altas producirán,

5 por supuesto, alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de los programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones por huecos. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores predeterminados al utilizar este tipo de software para comparaciones de secuencias. Por ejemplo, cuando se usa el paquete GCG Wisconsin Bestfit (véase más adelante), la penalización por hueco predeterminada para secuencias de aminoácidos es de -12 para un hueco y de -4 por cada extensión.

10 Por lo tanto, el cálculo del % máximo de identidad de secuencia requiere, en primer lugar, la generación de un alineamiento óptimo, teniendo en cuenta las penalizaciones por hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo dicho alineamiento es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Universidad de Wisconsin, EE. UU.). Devereux et al., 1984, *Nucleic Acids Research* 12:387). Otros ejemplos de software que pueden realizar comparaciones de secuencias 15 incluyen, pero no se limitan a, el paquete BLAST (véase Ausubel et al., 1999 ibid. - Capítulo 18), FASTA (Atschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.*, 403-410) y el paquete integrado de herramientas de comparación GENEWORKS. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para búsquedas en línea y fuera de línea (véase Ausubel et al., 1999 ibid., páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, se prefiere utilizar el programa GCG Bestfit.

20 Aunque la identidad de la secuencia final puede medirse en términos de identidad, el propio procedimiento de alineamiento no se basa normalmente en una comparación de pares de todo o nada. En su lugar, se usa generalmente una matriz de puntuación de similitud ajustada que asigna puntuaciones a cada comparación por pares basadas en la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz es la matriz BLOSUM62, la matriz predeterminada del paquete integrado de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin generalmente usan los valores predeterminados públicos o una tabla de comparación de símbolos personalizada, si se proporciona (véase el manual del usuario para más información). Se prefiere utilizar los valores predeterminados públicos del paquete GCG o, en el caso de otro software, la matriz predeterminada, tal como BLOSUM62.

25 Una vez que el software ha generado un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de identidad de secuencia. El software normalmente hace esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

30 El término "variante" según la presente invención incluye cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, delección o adición de uno (o más) aminoácidos de o a la secuencia, con la condición de que la secuencia de aminoácidos resultante conserve sustancialmente la misma actividad que la secuencia no modificada.

35 Se pueden hacer sustituciones conservadoras, por ejemplo, según la tabla a continuación. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna, y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna, pueden sustituirse entre sí:

ALIFÁTICO	No polar	G A P
		I L V
	Polar - sin carga	C S T M
		N Q
AROMÁTICO	Polar - cargado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

30 Un experto en la técnica comprenderá que numerosos polinucleótidos y ácidos nucleicos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. Además, debe entenderse que los expertos en la técnica pueden, mediante técnicas rutinarias, hacer sustituciones de nucleótidos que no afectan a la secuencia polipeptídica codificada por los polinucleótidos aquí descritos para reflejar el uso de codones de cualquier organismo hospedante particular en el que se van a expresar los polipéptidos.

35 Una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos como se describe en el presente documento puede comprender, consistir en o consistir esencialmente en una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos como se muestra en el presente documento.

Vector

40 La presente invención también proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico según la presente invención. Dicho vector se puede usar para introducir la secuencia de ácido nucleico en una célula hospedante de modo que exprese y produzca una molécula según el primer aspecto de la invención.

El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido o un vector viral, tal como un vector retroviral o un vector lentiviral.

El vector puede ser capaz de transfectar o transducir una célula T.

El vector también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen suicida, tal como iCasp9 o RQR8.

Un gen suicida es un mecanismo codificado genéticamente que permite la destrucción selectiva de células transferidas de forma adoptiva, tales como las células T, ante una toxicidad inaceptable.

- 5 La activación de la caspasa 9 produce la apoptosis celular. El mecanismo de activación detrás de la caspasa 9 fue explotado por la molécula iCasp9. Todo lo que se necesita para que la caspasa 9 se active, es superar la barrera energética para que la Caspasa 9 homodimerice. El homodímero experimenta un cambio conformacional y el dominio proteolítico de uno de un par de dímeros se activa. Fisiológicamente, esto ocurre mediante la unión del dominio CARD de la caspasa 9 a APAF-1. En iCasp9, el dominio APAF-1 se reemplaza por un FKBP12 modificado, que se ha mutado para unirse selectivamente a un inductor químico de dimerización (CID). La presencia del CID produce la homodimerización y la activación. iCasp9 se basa en una caspasa 9 humana modificada fusionada a una proteína de unión a FK506 humana (FKBP) (Straathof et al. (2005) *Blood* 105:4247-4254). Permite la dimerización condicional en presencia de una molécula pequeña de CID, conocida como AP1903.
- 10 15 La expresión de RQR8 hace que las células T sean susceptibles al anticuerpo anti-CD20 Rituximab, pero es más compacta que la molécula CD20 de longitud completa (Philip, B. et al. (2014) *Blood* doi:10.1182/blood-2014-01-545020).

Composición farmacéutica

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene un vector o una célula T que expresa CAR de la invención junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Dicha formulación 20 puede, por ejemplo, estar en una forma adecuada para infusión intravenosa.

Método

La presente invención también se refiere a un método para preparar una célula según la presente invención, que comprende la etapa de introducir una secuencia de ácido nucleico o un vector según la presente invención en una célula.

25 Las células que expresan CAR según la presente invención pueden crearse *ex vivo* ya sea de la propia sangre periférica del paciente (donante 1^o), o en el contexto de un trasplante de células madre hematopoyéticas de sangre periférica de donante (donante 2^o), o de sangre periférica de un donante emparentado (donante 3^o). Alternativamente, las células T CAR pueden derivarse de diferenciación *ex vivo* de células progenitoras inducibles o células progenitoras embrionarias a células T. En estos casos, las células T CAR se generan introduciendo ADN o ARN que codifica el CAR por uno de muchos medios, incluida transducción con un vector viral, transfección con ADN o ARN.

30 35 El método puede comprender además la estimulación de la célula con un agente estimulador de células T γδ. Como se usa en el presente documento, un "agente estimulador de células T γδ" se refiere a cualquier agente que estimule selectivamente la proliferación y/o supervivencia de las células T γδ de una población de células inicial mixta.

Por lo tanto, la población de células resultante se enriquece con un mayor número de células T γδ, por ejemplo células T γδ particulares que expresan un receptor TCR γδ particular, en comparación con la población de células inicial.

40 45 Las poblaciones de células T γδ producidas según la presente invención pueden enriquecerse con células T γδ, por ejemplo, células T γδ particulares que expresan un receptor TCR γδ particular. Es decir, la población de células T γδ producida según la presente invención tendrá un número mayor de células T γδ. Por ejemplo, la población de células T γδ de la invención tendrá un número mayor de células T γδ que expresan un receptor TCR γδ particular en comparación con las células T γδ en una muestra aislada de un sujeto. Es decir, la composición de la población de células T γδ diferirá de la de una población de células T "nativas" (es decir, una población que no se ha sometido a las etapas de expansión descritas en el presente documento), en cuanto que el porcentaje o proporción de células T γδ será mayor.

La población de células T γδ según la invención puede tener al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100% de células T γδ.

50 55 La población de células T γδ según la invención puede tener al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100% de células T γδ que expresan un receptor TCR γδ particular.

A modo de ejemplo, el agente estimulador de células T γδ puede ser pirofosfato de isopentenilo (IPP); un análogo de IPP (p. ej., pirofosfato de bromohidrina o pirofosfato de (E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enilo); un inhibidor de farnesil pirofosfato sintasa (FPPS) o un aminobisfosfonato tal como zoledronato o pamidronato.

El agente estimulador de células T γδ se puede utilizar en combinación con un mitógeno de células T general, por ejemplo, una citocina mitogénica tal como IL-2.

Se conocen en la técnica métodos adicionales de estimulación de células T γδ e incluyen, por ejemplo, el uso de

concanavalina A (Siegers, G. M. et al. *PLoS ONE* 6, e16700 (2011)), anticuerpos anti-TCR y/o inmovilizados en plástico; células presentadoras de antígenos artificiales diseñadas como alimentadores y células presentadoras de antígenos artificiales diseñadas recubiertas con anticuerpo anti-TCR y/o (Fisher, J. et al.; *Clin. Cancer Res.* (2014)).

Método de tratamiento

5 Un vector o célula T de la invención para usar en el tratamiento de enfermedades se refiere al uso terapéutico de dicho vector o célula T de la invención. En este sentido, el vector o célula T puede administrarse a un sujeto que tiene una enfermedad o afección existente con el fin de disminuir, reducir o mejorar al menos un síntoma asociado con la enfermedad y/o ralentizar, reducir o bloquear la progresión de la enfermedad.

10 Las células T que expresan CAR pueden crearse *ex vivo* ya sea de la propia sangre periférica del paciente (donante 1^o), o en el contexto de un trasplante de células madre hematopoyéticas de sangre periférica de donante (donante 2^o), o de sangre periférica de un donante no emparentado (donante 3^o). Alternativamente, las células T CAR pueden derivar de diferenciación *ex vivo* de células progenitoras inducibles o células progenitoras embrionarias a células T. En estos casos, las células T CAR se generan introduciendo ADN o ARN que codifica el CAR por uno de muchos medios, incluida transducción con un vector viral, transfección con ADN o ARN.

15 En una realización, la muestra que comprende células T y/o puede haber sido aislada previamente del sujeto.

Una célula T CAR, según la presente invención, puede generarse mediante un método como el descrito en el presente documento. En particular, una célula T que expresa CAR para usar en el tratamiento de una enfermedad puede generarse mediante las etapas de transducción de la célula T con un vector viral o transfección con ADN o ARN que codifica el CAR coestimulador, como se describe en el presente documento, y expansión de las células T y/o usando 20 un agente estimulador de células T y/o.

El agente estimulador de células T y/o puede ser pirofosfato de isopentenilo (IPP); un análogo de IPP (p. ej., pirofosfato de bromohidrina o pirofosfato de (E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enilo); un inhibidor de farnesil pirofosfato sintasa (FPPS) o aminobisfosfonatos tales como zoledronato o pamidronato, por ejemplo.

25 Las células T que expresan una molécula CAR de la presente invención pueden usarse para el tratamiento de diversas enfermedades, incluidas, por ejemplo, cáncer, infección microbiana e infección viral.

El cáncer puede ser, por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (células renales), cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, melanoma, leucemia, linfoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata o cáncer de tiroides.

30 Los métodos y usos según la presente invención pueden practicarse en combinación con composiciones adicionales. Por ejemplo, si la enfermedad a tratar es el cáncer, la composición de la presente invención puede administrarse en combinación con terapias adicionales contra el cáncer, tales como quimioterapia y/o radioterapia.

35 Una composición de la presente invención se puede administrar en combinación con un agente estimulador de células T y/o tal como pirofosfato de isopentenilo (IPP); un análogo de IPP (p. ej., pirofosfato de bromohidrina o pirofosfato de (E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enilo); un inhibidor de farnesil pirofosfato sintasa (FPPS) o aminobisfosfonatos tales como zoledronato o pamidronato.

En particular, el zoledronato y el pamidronato se pueden utilizar para la expansión *in vivo* de células T y/o Vδ2+ en combinación con IL-2. Hay varios ensayos clínicos de fase I que han utilizado este enfoque (véase Fisher et al.; *Oncolimmunology*, 3; e27572).

40 "En combinación" puede referirse a la administración de la terapia adicional o del agente estimulador de células T y/o antes, al mismo tiempo que o después de la administración de la composición según la presente invención.

La invención se describirá ahora con más detalle mediante ejemplos, que tienen como objetivo ayudar a un experto en la técnica a llevar a cabo la invención y no pretenden de ninguna manera limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Generación de células T y/o que expresan un CAR coestimulador

45 Se extrajeron PBMC de sangre de donantes sanos usando separación por gradiente de densidad Ficoll. Se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con FCS al 10%, penicilina/estreptomicina al 1%, IL-2 humana 100 u/ml y ácido zoledrónico 5 µM durante 5 días.

Después de 5 días se transdijeron con retrovirus que contenía la construcción CAR fusionada a RQR8, que actúa como un gen marcador y también proporciona un gen suicida sensible a Rituximab (αCD20).

50 El CAR ilustrativo descrito en el presente documento incluye un scFv específico de aGD2, un conector basado en la porción Fc de IgG1, un dominio transmembrana derivado de CD28 y el endodomnio de DAP10 (véase la Figura 10).

Un segundo CAR ilustrativo incluye un scFv específico de CD33, un conector basado en la porción Fc de IgG1, un dominio transmembrana derivado de CD28 y el endodomino de DAP10 (ver Figura 11).

Se demostró la coexpresión de un CAR anti-GD2-Fc-DAP10 con el TCR endógeno de una célula T y δ (Figura 4).

5 Ejemplo 2 - Destrucción de las líneas celulares GD2+ LAN1 y TC71 por células T y δ V δ 2 transducidas con el CAR aGD2-Fc-DAP10

Se sabe que las líneas celulares tanto LAN1 como TC71 expresan GD2.

Solo se observó una destrucción significativa de la línea celular de neuroblastoma GD2+ LAN1 cuando se usaron células transducidas con CAR y no cuando se usaron células V δ 2 no transducidas (NT) como efectoras (Figura 5A).

10 Había un efecto aditivo contra la línea celular de sarcoma de Ewing GD2+ TC71 cuando se usó el CAR aGD2-Fc-DAP10 en combinación con tratamiento con ácido zoledrónico de 24 horas (Figura 5B).

La adición del CAR a las células T $\alpha\beta$, que carecen de la señal 1 proporcionada por el TCRy δ en respuesta al estrés celular, no tuvo efecto sobre la citotoxicidad, a diferencia del efecto del CAR en las células T y δ V δ 2+ (Figura 5C). Esto indica que la señal del CAR sola es insuficiente para la activación de las células T.

15 La expresión del CAR aGD2-Fc-DAP10 en las células T y δ no dio como resultado la destrucción específica de GD2 de las células SK-N-SH negativas para GD2 (Figura 6).

Ejemplo 3: Conservación de la expresión de CAR después de cocultivo prolongado y expansión específica de GD2

El cocultivo se inició 24 días después de la transducción y se realizaron análisis seriados de las células para detectar la presencia de CAR y TCRV δ 2 en presencia de células de neuroblastoma GD2+ (LAN1) y GD2- (SK-N-SH) irradiadas (Figura 7A).

20 La expansión de células V δ 2+ transducidas con aGD2-Fc-DAP10 solo se observó en presencia de células diana GD2+ irradiadas (Figura 7B).

Ejemplo 4: Destrucción específica de células de AML CD33+ pero no de monocitos CD33+ por células T y δ que expresan un CAR anti-CD33-DAP10

Se demostraron niveles equivalentes de expresión de CD33 en tres líneas celulares de AML y monocitos (Figura 8).

25 Las células T y δ V δ 2 se transdijeron con una construcción de CAR anti-CD33-Fc-DAP10 o anti-CD33-Fc-CD28-CD3z.

La construcción de CAR anti-CD33-Fc-CD28-CD3z proporciona la señal 1 y la señal 2 en presencia de CD33. El anti-CD33-Fc-DAP10 proporciona la señal 2 en presencia de CD33.

Las células transducidas con el CAR aCD33-CD28-CD3z destruyeron cualquier célula CD33 positiva y no preservaron los monocitos sanos. Las células transducidas con el CAR aCD33-Fc-DAP10 no destruyen monocitos (Figura 9A).

30 Se observó un incremento significativo en la destrucción de AML, pero no incremento en la muerte de monocitos por las células T y δ V δ 2 transducidas con el CAR aCD33-Fc-DAP10 en comparación con los controles no transducidos (Figura 9B).

35 Diversas modificaciones y variaciones de los métodos y sistemas descritos de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica, sin apartarse del alcance de la invención. Si bien la invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención, como se reivindica, no debe limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención, que sean evidentes para los expertos en biología molecular, inmunología celular o campos afines, pretenden estar incluidos en el alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una célula T que expresa un receptor de células T gamma-delta (TCR) y un receptor de antígeno químérico (CAR), en donde el TCR se usa para proporcionar una señal 1 para la activación de las células T y el CAR se usa para proporcionar una señal coestimuladora 2, en donde el CAR comprende:
 - 5 (i) un dominio de unión al antígeno;
 - (ii) un dominio transmembrana; y
 - (iii) un dominio de señalización intracelular coestimulador de un coreceptor de señalización de células T que, al unirse el antígeno al dominio de unión al antígeno del CAR, proporciona una señal coestimuladora y transmite la señal 2 a la célula T gamma delta y no transmite la señal 1 a la célula T gamma delta tras la unión del antígeno diana;
- 10 el TCR gamma delta y el CAR dispuestos de manera que el TCR gamma delta proporciona la señal 1 y el CAR proporciona la señal 2 tras la unión a cada receptor respectivamente, en donde la célula T gamma delta solo estará completamente activada y será capaz de destruir una célula diana que exprese un primer antígeno capaz de unirse al TCR gamma delta y un segundo antígeno que sea capaz de unirse al CAR; y
 - 15 en donde el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización de DAP10;
 - en donde el dominio de unión al antígeno es capaz de unirse a GD2 o CD33;
 - en donde el dominio transmembrana comprende un tallo de CD8 o un dominio transmembrana de CD28;
 - en donde el CAR comprende además un dominio espaciador entre el dominio de unión al antígeno y el dominio transmembrana; y
 - en donde el dominio espaciador está definido por una región Fc.
- 20 2. Una célula según cualquier reivindicación precedente, en donde el TCR gamma-delta es capaz de unirse a un fosfoantígeno; cadena A relacionada con el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MICA); cadena B relacionada con el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MICB); ligando 1-6 de NKG2D (ULBP 1-6); CD1c; CD1 d; receptor de proteína C endotelial (EPCR); lipohexapéptido; ficoeritrina o histidil-ARNt-sintasa.
3. Un CAR que comprende
 - 25 (i) un dominio de unión al antígeno;
 - (ii) un dominio transmembrana; y
 - (iii) un dominio de señalización intracelular;
 en donde el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular coestimulador de DAP10 pero no comprende un endodomino de CD3 en donde el CAR comprende:
 - 30 - un dominio de unión al antígeno capaz de unirse a GD2 o CD33;
 - un dominio transmembrana que comprende un tallo de CD8 o un dominio transmembrana de CD28; y
 - un dominio espaciador entre el dominio de unión al antígeno y el dominio transmembrana, en donde el dominio espaciador está definido por una región Fc.
- 35 4. Una célula T según la reivindicación 1 o un CAR según la reivindicación 3, en donde el coreceptor de señalización de células T es un coreceptor de señalización de células T gamma delta, opcionalmente en donde el coreceptor es DAP10.
5. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR como se define en la reivindicación 3.
6. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico como se define en la reivindicación 5, opcionalmente en donde el vector es un vector retroviral, un vector lentiviral o un transposón.
- 40 7. Un método para preparar una célula según la reivindicación 1 o reivindicación 2, que comprende la etapa de introducir: una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 5 o un vector según la reivindicación 6 en una célula.
8. Una composición farmacéutica que comprende una célula según la reivindicación 1 o reivindicación 2, un CAR según la reivindicación 3, una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 5 o un vector según la reivindicación 6.
9. Una composición farmacéutica según la reivindicación 8, para usar en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.
- 45 10. Una composición farmacéutica según la reivindicación 8, para usar en el tratamiento del cáncer.

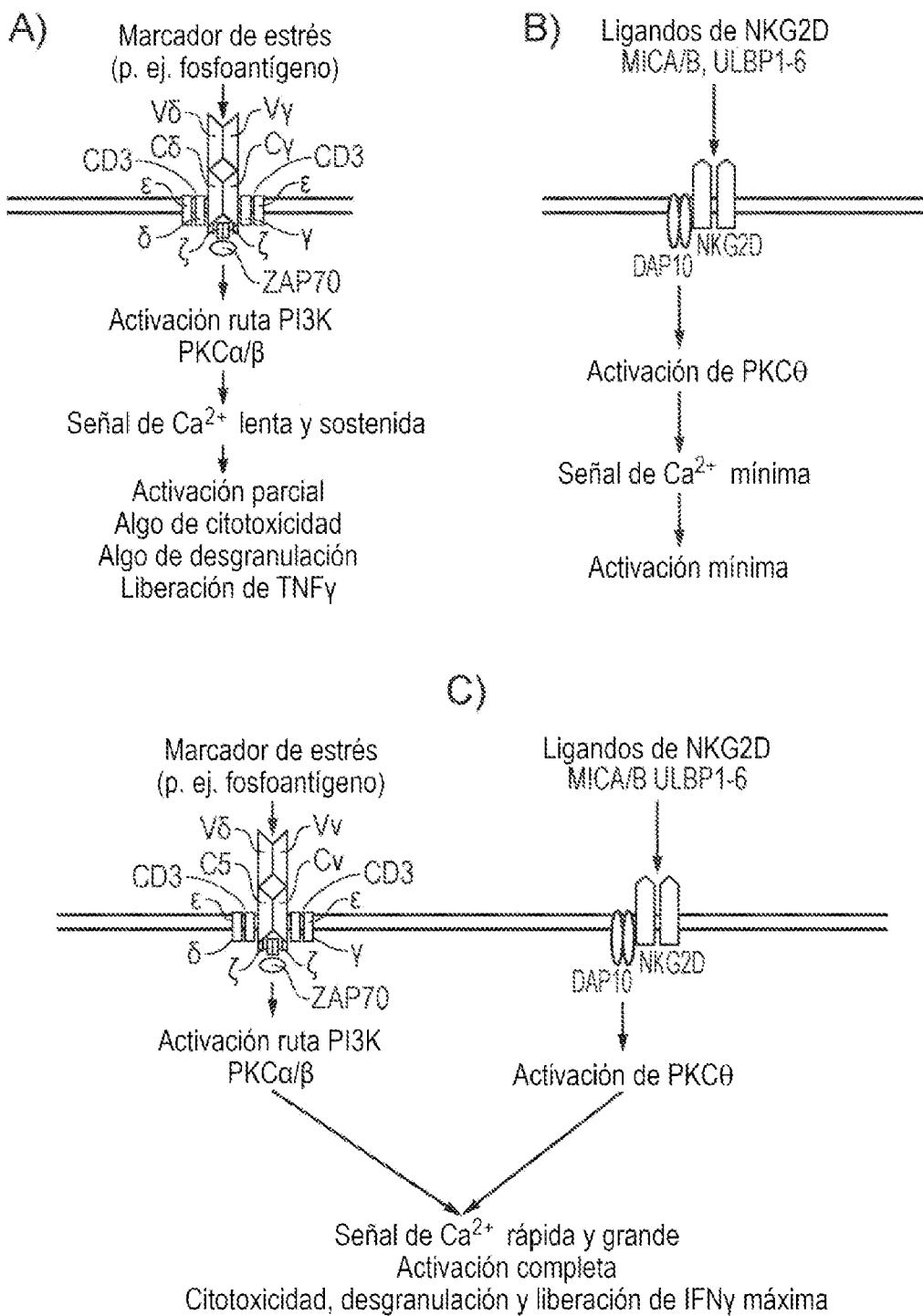


FIG. 1

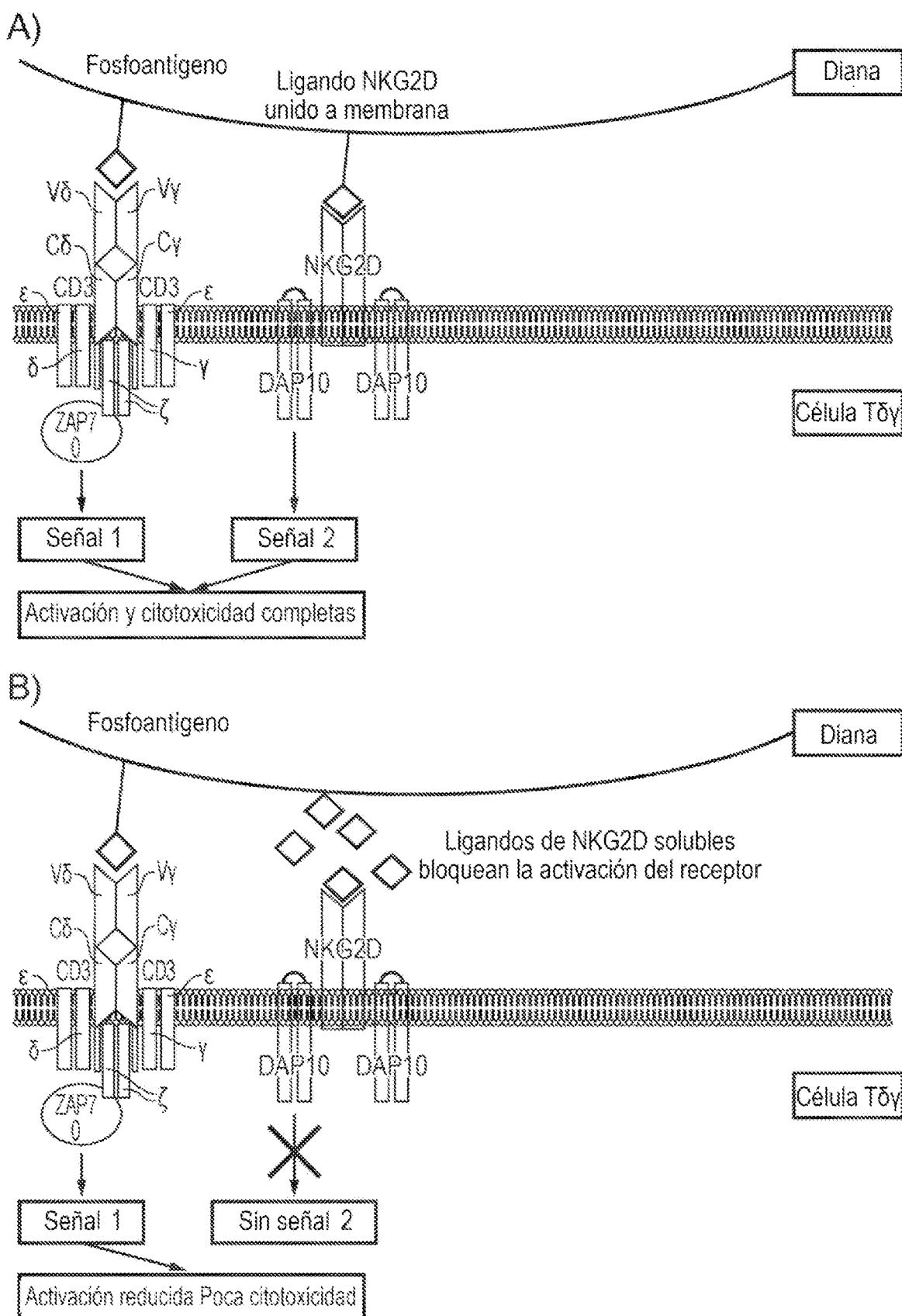


FIG. 2

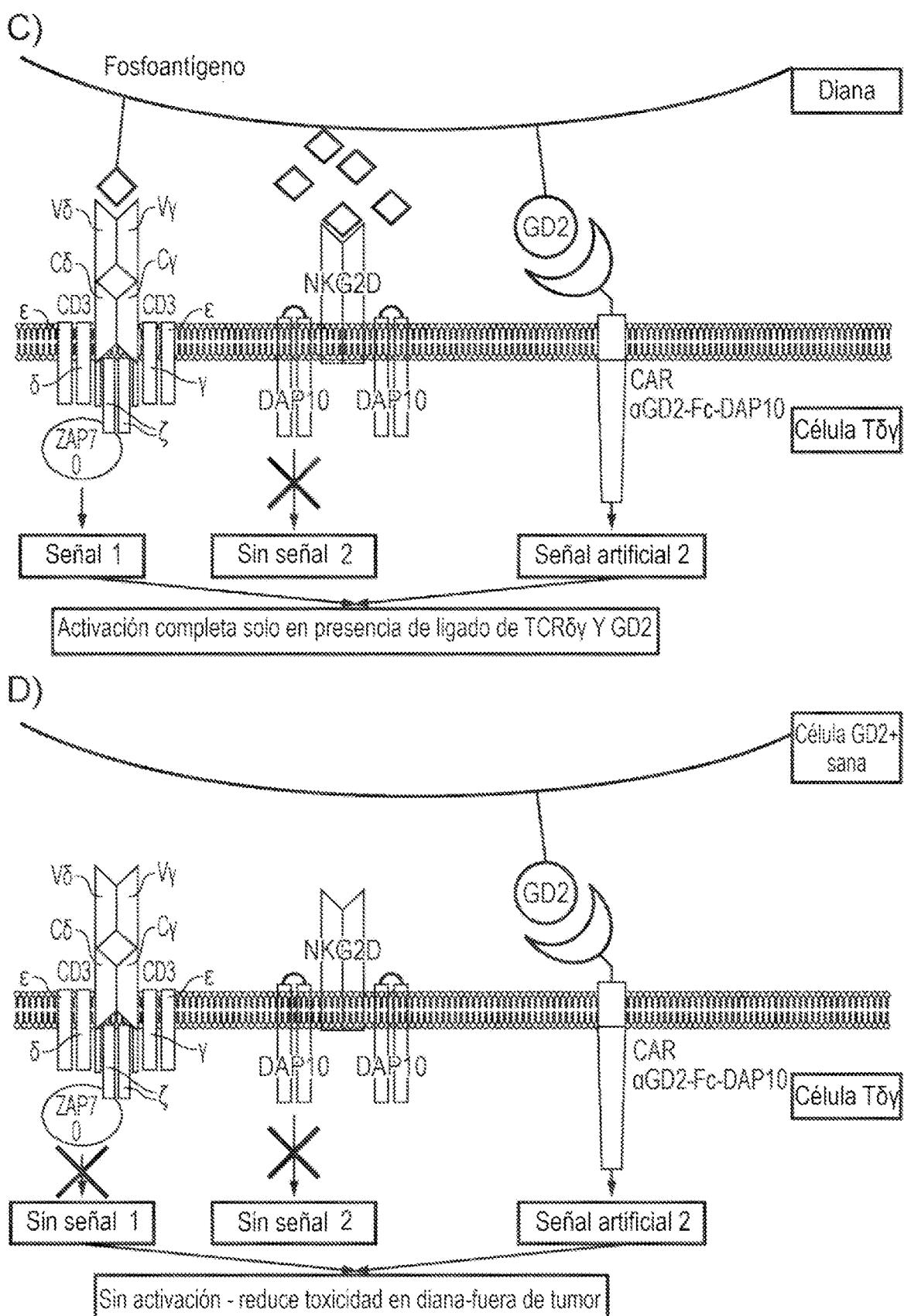


FIG. 2 (Continuación)

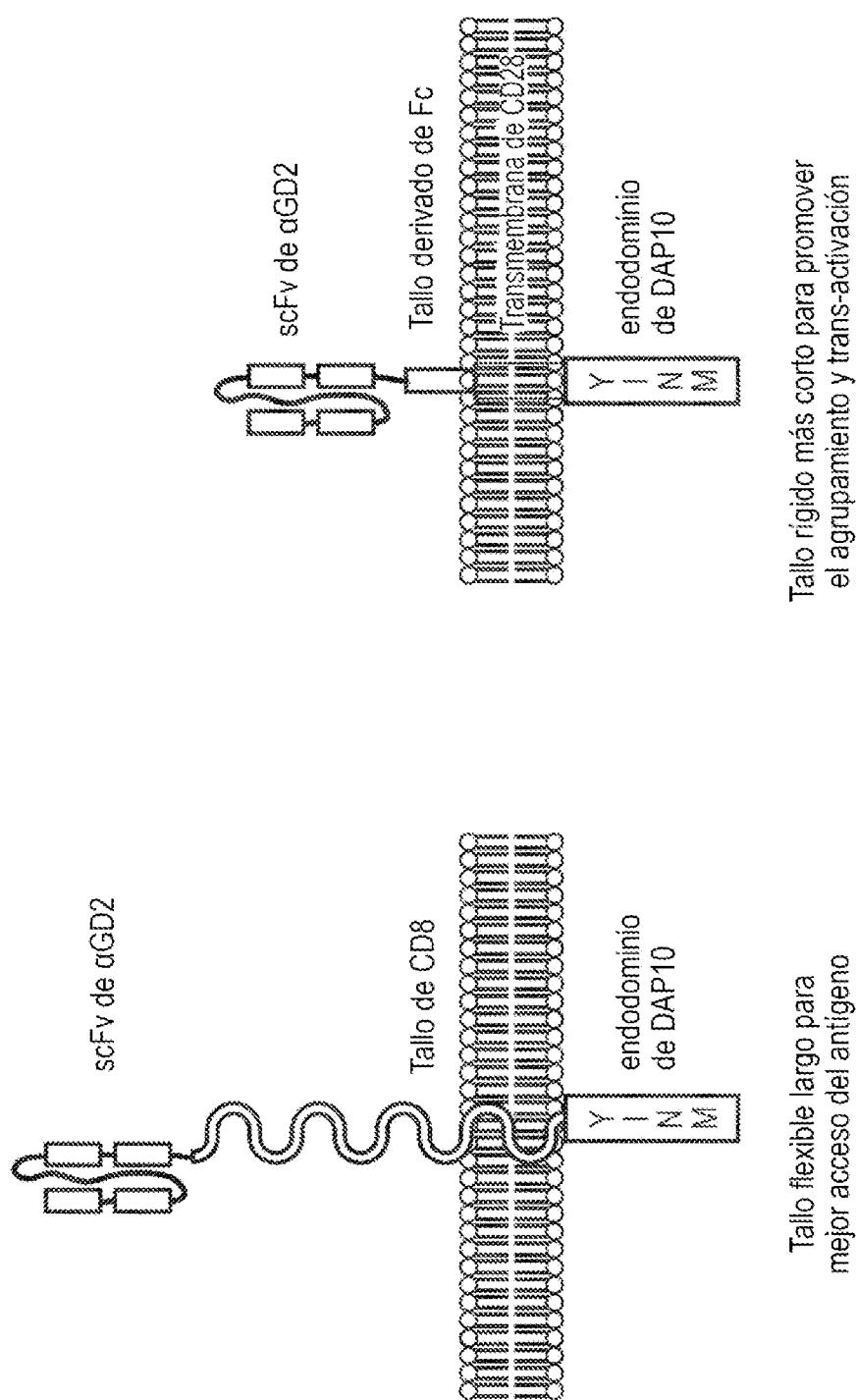


FIG. 3

Tallo rígido más corto para promover el agrupamiento y trans-activación

Tallo flexible largo para mejor acceso del antígeno

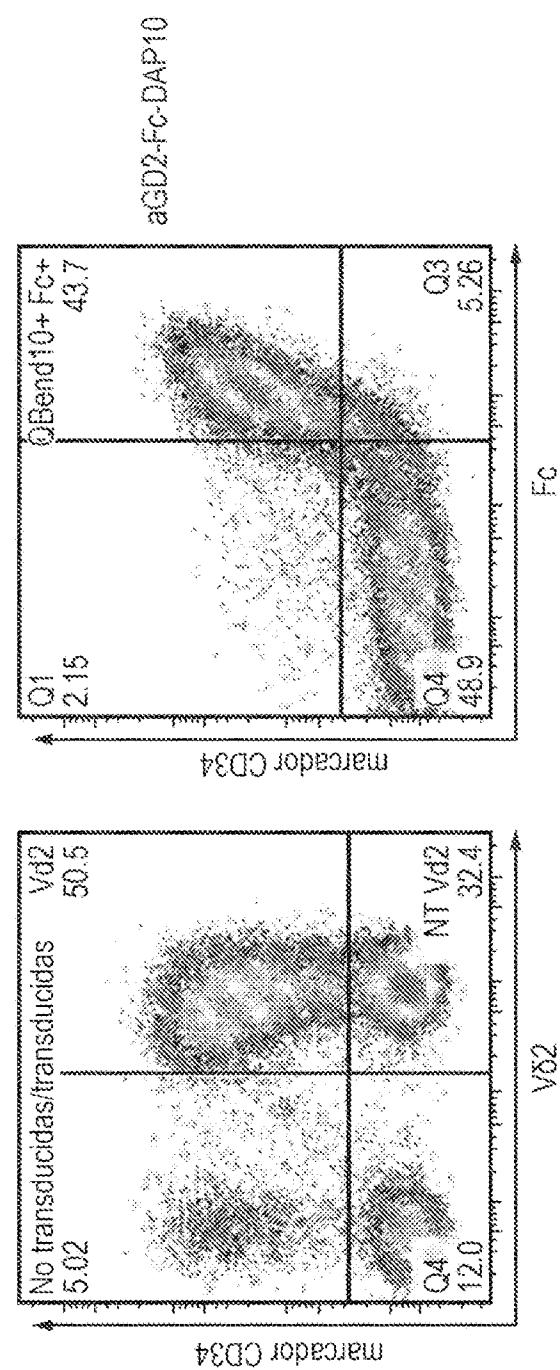
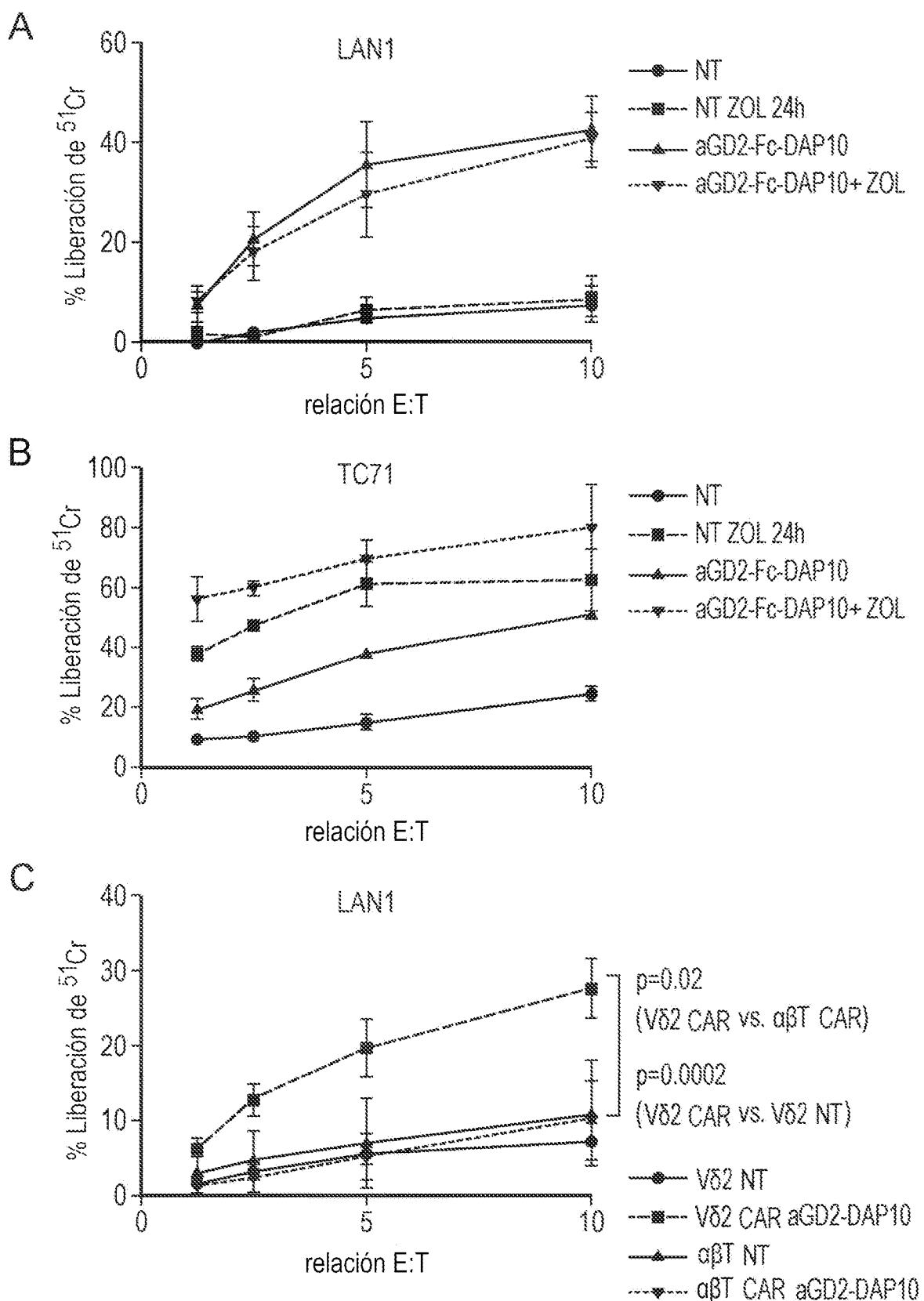
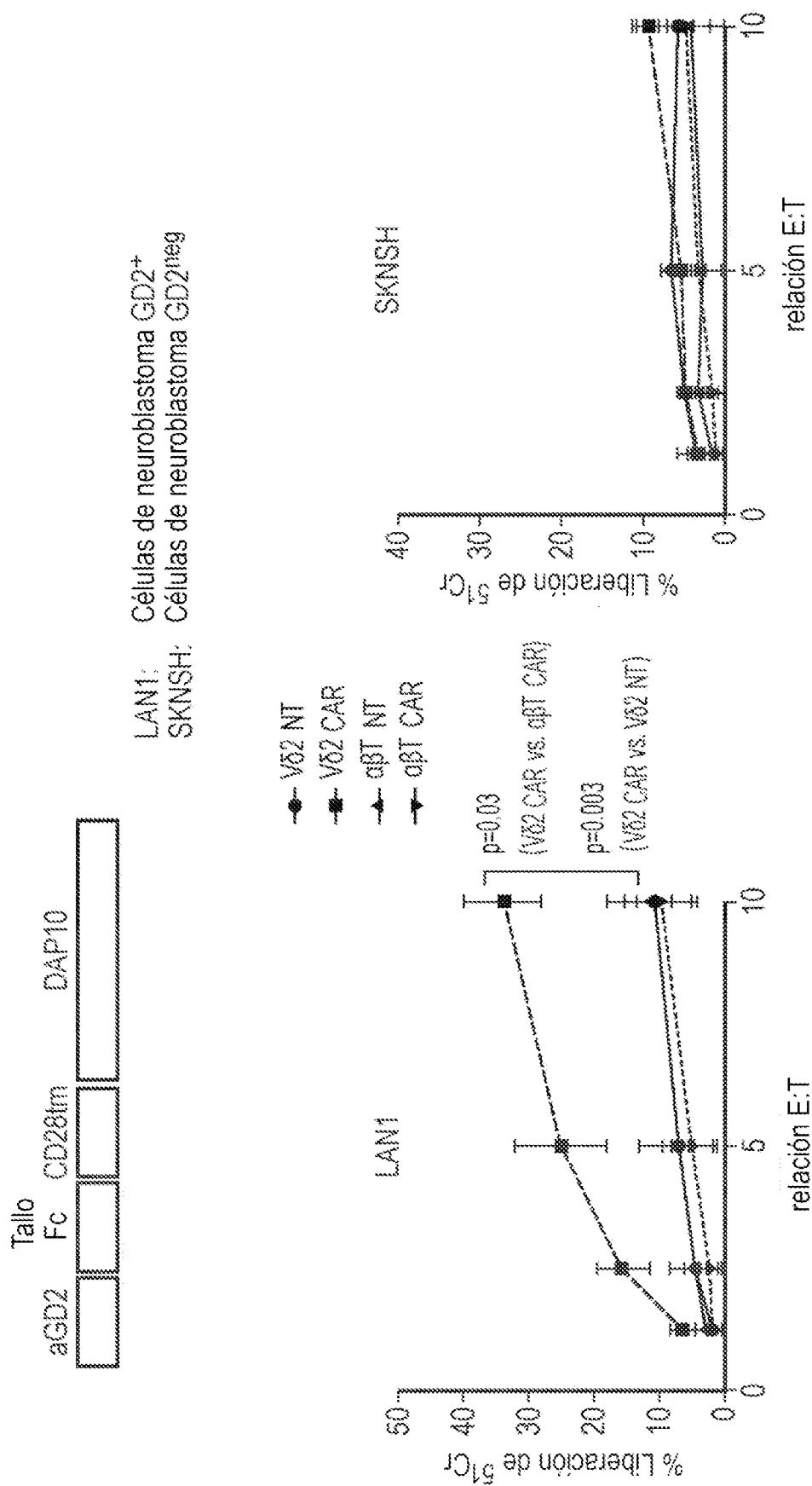


FIG. 4



Las barras de error indican EEM para n=3-6 donantes independientes

FIG. 5



四〇

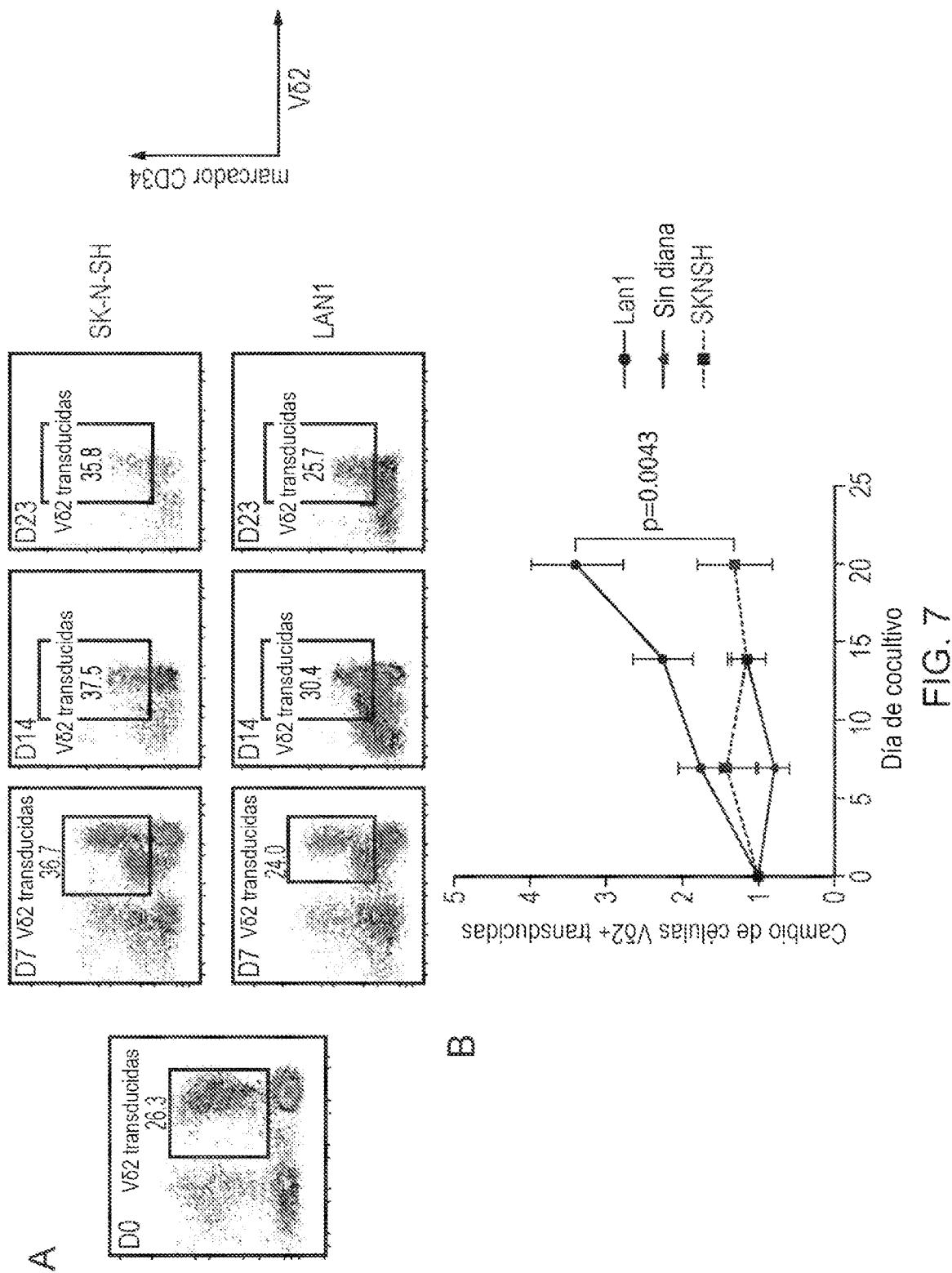


FIG. 7

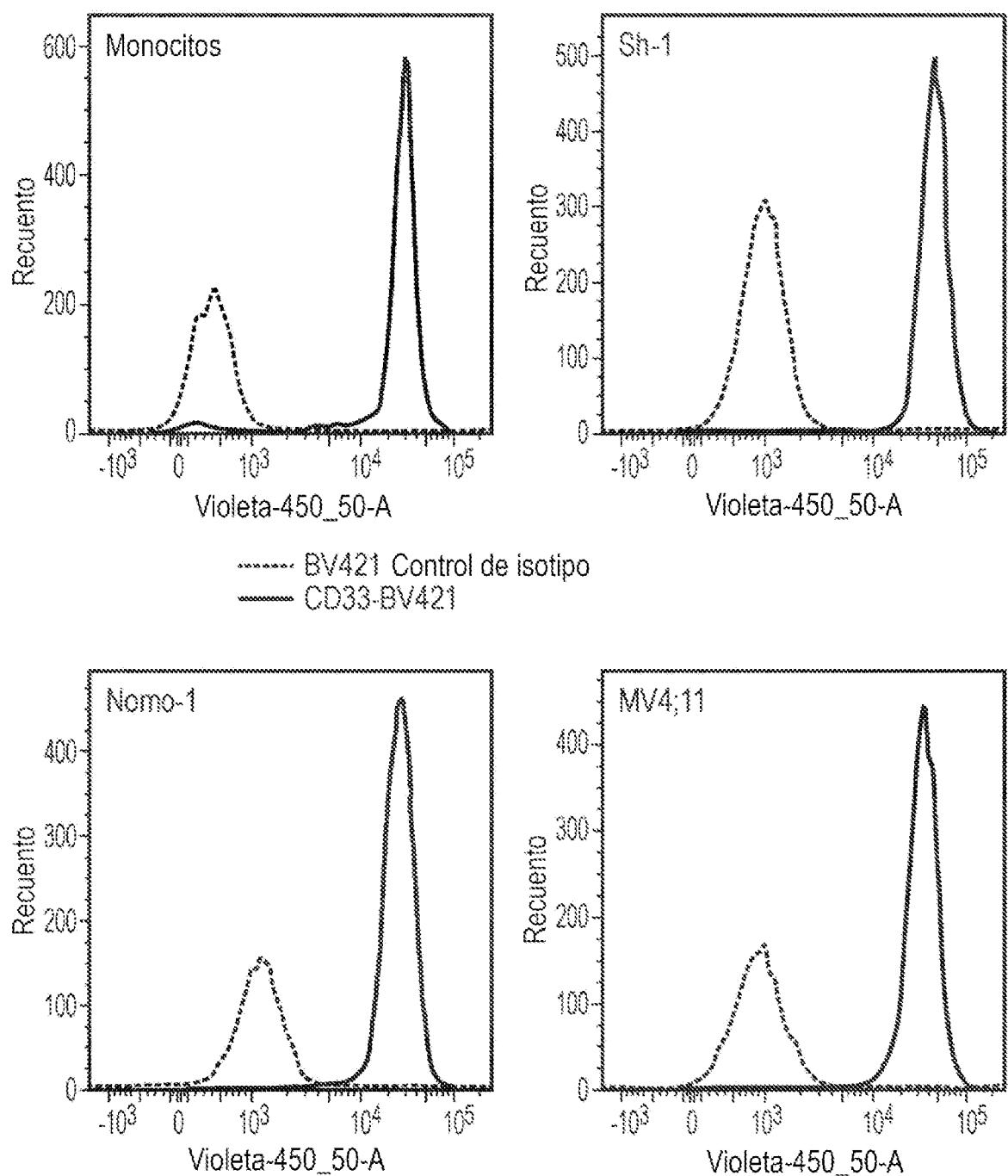


FIG. 8

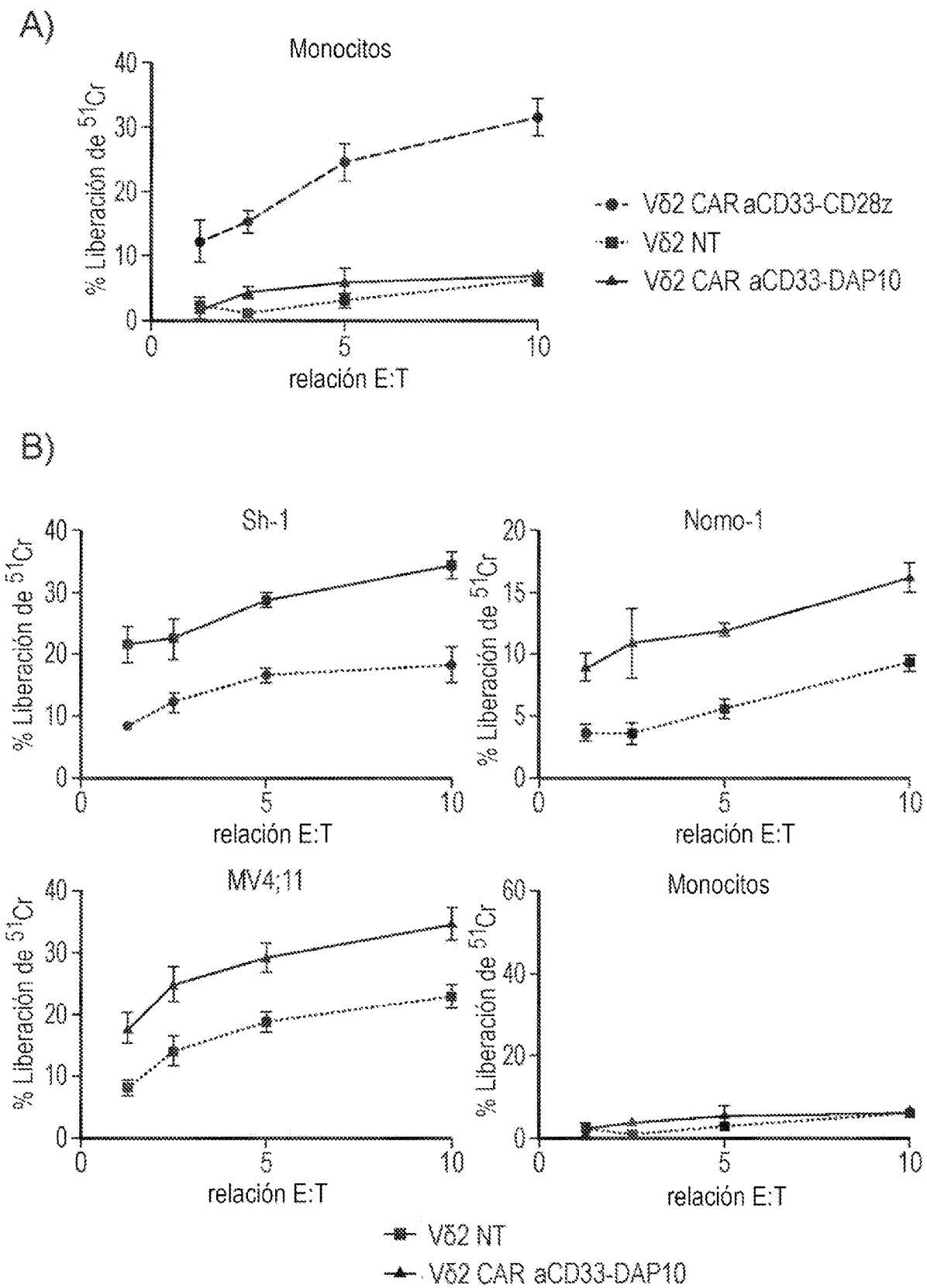


FIG. 9

Secuencia de nucleótidos del CAR aGD2-Fc-DAP10 (SEQ ID NO: 5)

```

ATGGAGACCGACACCCCTGCTGCTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCA
GGCAGCACCGGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGCCAGGCCCTGGT
GAAGCCCAGCCAGACCCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCTTCAG
CCTGGCCAGCTACAACATCCACTGGGTGCGGCAGCCCCAGGCAAGGG
CCTGGAGTGGCTGGCGTGTGGCTGGCGCAGCACCAACTACAA
CAGCGCCCTGATGAGCCGGCTGACCATCAGCAAGGACAACAGCAAGAA
CCAGGTGTTCTGAAGATGAGCAGCCTGACAGCCGCCACACGCCGT
GTACTACTGCGCCAAGCGGAGCGACGACTACAGCTGGTTGCCTACTG
GGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCTCTGGCGGAGGCGCTCTG
GCGGAGGGGGCTCTGGCGGAGGCGGAGCGAGAACAGATGACCCAG
AGCCCCAGCAGCTTGAGCGCCAGCGTGGCGACCGGGTGACCATGACC
TGCAGAGCCAGCAGCAGCGTGAGCAGCAGCTACCTGCACTGGTACCAAG
CAGAAGAGCGGCAAGGCCAAAGGTGTGGATCTACAGCACCAGAAC
CTGGCCAGCGGCGTGCCAGCCGGTTAGCGGCAGCGGAGCGGAGCAGCGGAC
CGACTACACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAAGCCGAGGACTTCGCCAC
CTACTACTGCCAGCAGTACAGCGGCTACCCATCACCTTCGGCCAGGGC
ACCAAGGTGGAGATCAAGCGGTGGATCCCGCCAGCACCTCCGTGGCGGC
GACAAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTCCGTGGCGGC
CCGTCAGTCTTCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCATGATCG
CCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAG
ACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT
GGTCAGCGTCCTACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
GTACAAGTGCAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGACACAGGTGTACACO
CTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCGGTAGCCCTGGGACAGCCTGACC
TGCTGGTCAAAGGCTTCTACAGCAGCATGCCGTGGAGTGGAG
AGCAATGGGCAACCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCTTCTTCTACAGCAAGCTACCCGTGGACAAGA
GCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG
CCCTGCACAATCACTATAACCCAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCAGGCAA
GAAGGACCCAAGTTCTGGGTCTGGTGGTGGGGAGGCGTGGC
CTGTTACTCTCTGGTGACCGTGGCCTCATCATCTCTGGGTGTG
GCCAGACCACGGCGGAGCCCAGCCCAGGAGGACGGCAAGGTGTACAT
CAACATGCCCGGGCGCGCTGA

```

Secuencia de aminoácidos del CAR aGD2-Fc-DAP10 (SEQ ID NO: 2)

```

METDTLLLWLLLWPGSTGQVQLQESGPGLVKPSQTLSITCTVSGFSLAS
YNIHWRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTNYNSALMSRLTISKDNSKNQVFLKM
SSLTAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGGGG
GSENQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCRASSSVSSYLHWYQQKSGKAPKM
WIYSTSNLASGVPSRFSGSGSTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSGYPITF
GQGTKVEIKRSDPAEPKSPDKHTCPPCPAPPVAGPSVFLPPKPKDTLMIA
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRWVSI
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD

```

FIG. 10

ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVLW
VGGVLACYSLLTVAFIIFWICARPRRSPAQEDGKVKYINMPGRG

Clave

scFV anti-GD2

Espaciador CH2CH3 con mutación PPVA para prevenir la unión a receptores Fcγ

Dominio transmembrana de CD28

Endodomino de DAP10

FIG. 10 (Continuación)

Secuencia de nucleótidos del CAR aCD33-Fc-DAP10 (SEQ ID NO: 4)

```

ATGGCCGTGCCCACTCAGGTCTGGGTTGGCTACTGTGGCTTACAG
ATGCCAGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTTCCCTGCTGCA
TCTGTCGGAGATCGCGTACCCATCACCTGTCGAGCAAGTGAGGACATT
ATTTAATTAGTGTGGTATCAGCAGAAACCAAGGAAAGGCCCCATAAGCTC
CTGATCTATGATAAAATCGCTTGGCAGATGGGTCCTACGGTTCA
GTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCTAACGCTGCA
ACCCGAAGATTCGCAACCTATTATGTCAACACTATAAGAATTATCCGCT
CACGTTCGGTCAAGGGACCAAGCTGGAAATCAAAGATCTGGTGGCGG
AGGGTCAGGAGGGGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGCTGGGAGGGCGGA
GGCTCGAGATCTGAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGCGGCTGGTG
CAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCTGTGCAGCCTCAGGATTCACTC
TCAGTAATTATGGCATGCCTGGATCAGGCAGGCTCCAGGGAAAGGGTCT
GGAGTGGGTCGCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTATCGAG
ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAGCAC
CCTCTACCTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTAT
TACTGTGCAGCACAGGACGCTTACGGGAGGTACTTGTATTACTGGG
GCCAAGGAACGCTGGTCACAGTCTCGTCTATGGATCCCAGGAGGCCA
AAATCCTGACAAAACTCACACATGCCAACCGTGCCCCAGCACCTCCCCT
GGCCGGCCCCGTCACTTCCCTTCCCCCAAAACCCAGGACACCCCTG
ATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGTTACGTTGGACGGCGTGGAG
CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGTTACGTTGGACGGCGTGGAG
GTGATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCAT
CGAGAAAACATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCAGAACACCACAGGT
GTACACCCTGCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCCAGGTCAAG
CCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGCAACCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCC
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTTCTCATGCTCCGTGATGC
ATGAGGCCCTGCACAAATCATACCCAGAAATCTCTGAGTCTGAGGCC
AGGCAAGAAGGACCCCAAGTTCTGGGTCTGGTGGTGGTGGGAGGCCT
GCTGGCCTGTTACTCTCTGGTGCACCGTGGCCTCATCATCTCTGG
GTGTGCGCCAGACCACGGGGAGCCCAGCCCAGGGAGGACGGCAAGGT
GTACATCAACATGCCCGGCCGCGCTGA

```

Secuencia de aminoácidos del CAR aCD33-Fc-DAP10 (SEQ ID NO: 1)

```

MAVPTQVLGLLLLWLTNDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYFN
LVWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISLQPEDFA
TYYCQHYKNYPLTFQGQTKLEIKRSGGGGSGGGSGGGSGGGSRSEV
QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKLEWSSIS
LNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYT
GGYFDYWGQGTIVTVSSMDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLPPI
KPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQW

```

FIG. 11

YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNFSCSVWHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD
PKFWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFWMCARPRRSPAQEDGKVYINMPGR
G

Clave

[scFV anti-CD33]

[Espaciador CH2CH3 con mutación PPVA para prevenir la unión a receptores Fc]

[Dominio transmembrana de CD28]

[Endodomino de DAP10]

FIG. 11 (Continuación)

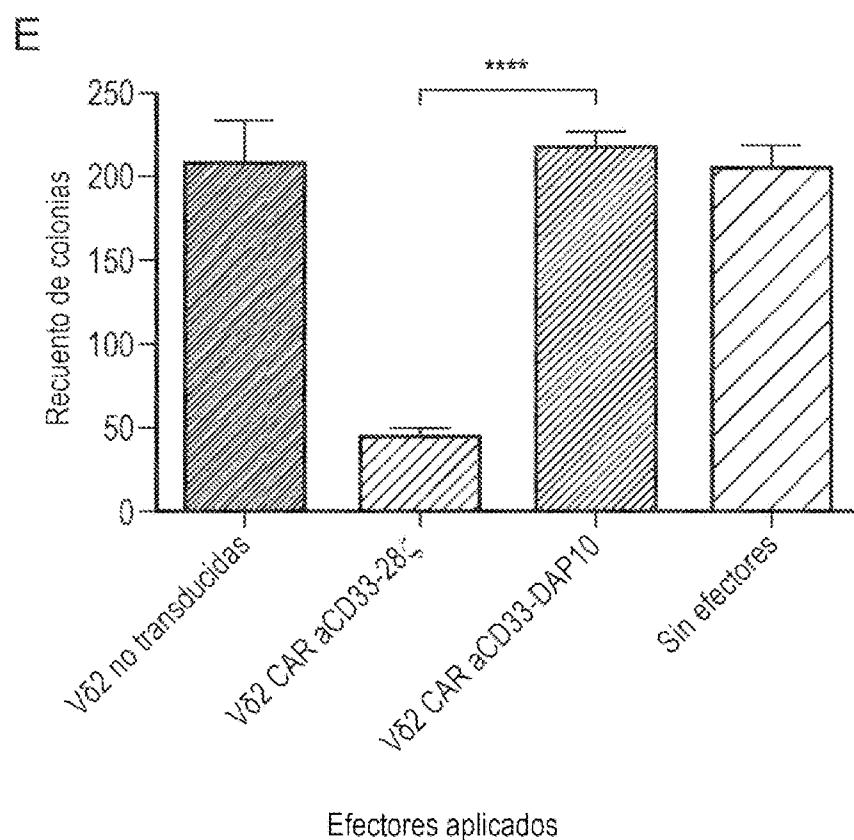


FIG. 12

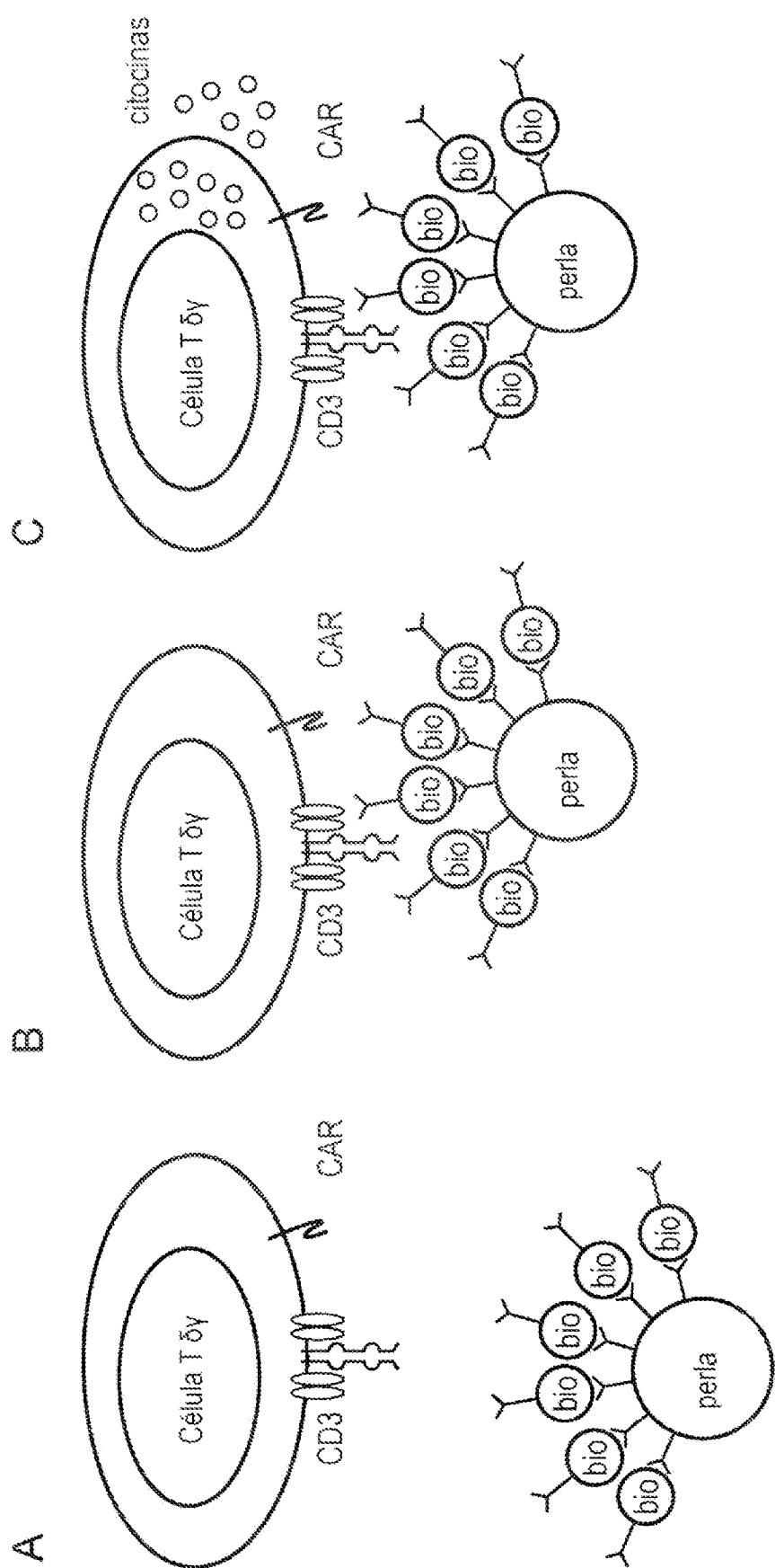


FIG. 13

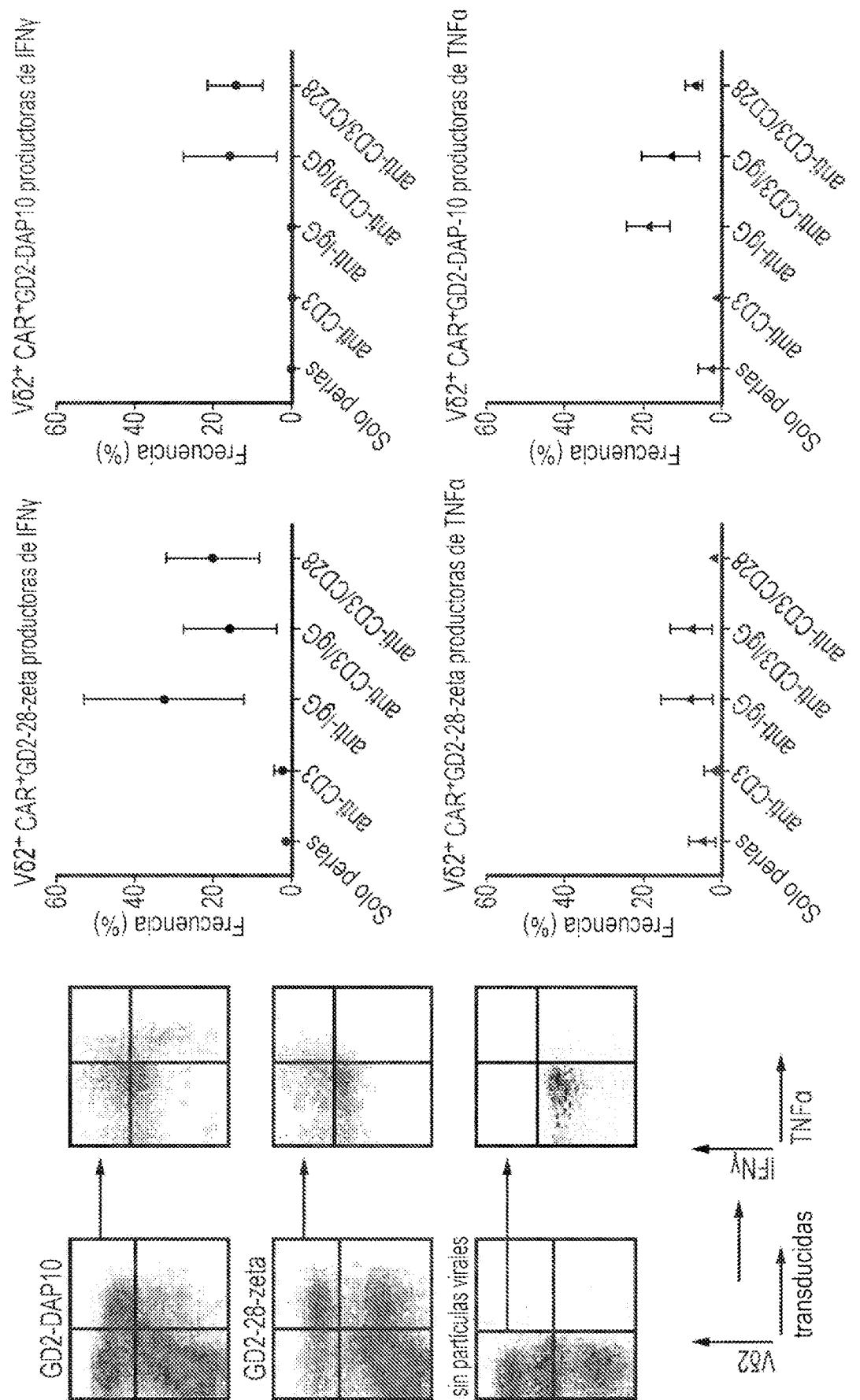


FIG. 13 (Continuación)