

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 729**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
B82Y 5/00	(2011.01)
C07K 14/725	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2014 PCT/US2014/016449**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014 WO14127220**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2014 E 14751537 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 2956481**

54 Título: **Redirectores de células T específicas de antígenos**

30 Prioridad:

15.02.2013 US 201361765263 P
14.03.2013 US 201361783852 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2021

73 Titular/es:

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)
3400 North Charles Street
Baltimore, MD 21218, US

72 Inventor/es:

SCHNECK, JONATHAN y
SCHUETZ, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 820 729 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

Redirectores de células T específicas de antígenos

- 5 Esta solicitud reivindica prioridad del documento No. de serie 61/765.263 presentado el 15 de febrero de 2013 y No. de serie 61/783.852 presentado el 14 de marzo de 2013 e incorpora cada una de estas solicitudes por referencia.

Campo técnico

- 10 Esta descripción se refiere generalmente a la inmunoterapia.

Breve descripción de los dibujos

15 **FIG. 1A.** Esquemas que muestran la preparación de lechos de redireccionamiento basados en anticuerpos clonotípicos y MHC-Ig (Ejemplo 1). Se incubaron microlechos de anti-IgG₁ de ratón con mAb anti-CD19 humano y con anticuerpo clonotípico 2C-TCR (1B2) o con moléculas MHC-Ig cargadas con péptido. Los lechos control se incubaron solo con uno de los anticuerpos 1B2, MHC-Ig o CD19. Se generaron lechos control adicionales usando un control de isotipo de mAb IgG₁.

20 **FIG. 1B.** Gráficos que muestran los resultados de los experimentos de citometría de flujo (Ejemplo 2). Se incubaron células efectoras (células T CD8⁺ 2C) y células diana (T2) con varios tipos de lechos a 4 °C durante 15 minutos, se lavaron y se tiñeron con anti-IgG₁ de ratón conjugado con ficoeritrina ("anti-IgG₁ de ratón-PE "). "MHC-Ig" representa el marcaje de las células 2C o T2 con lechos de redireccionamiento generados K^b-Ig cargados con péptido SIY 4 °C durante 45 min.

25 **FIG. 2A-C.** Los lechos de redireccionamiento inducen la formación de conjugados (Ejemplo 3). **FIG. 2A.** Esquema de una configuración experimental para un ensayo de conjugación. **FIG. 2B.** Datos de citometría de flujo de un ejemplo de un ensayo de formación de conjugados. Las células marcadas con PKH se cocultivaron con los lechos indicados a 4 °C toda la noche en una relación E:T 1:1. Los lechos control eran lechos con anticuerpos de control de isotipo mAb IgG₁ inmovilizados. **FIG. 2C.** Resumen de 2-12 ensayos de conjugación independientes realizados con células diana T2 y células efectoras 2C. "K^b-SIY" representa lechos preparados con dímero K^b-Ig cargado con péptido SIY en lugar de 1B2. (* = p < 0,01, ** = p < 0,001)

35 **FIG. 3A-C.** Especificidad y estabilidad de la unión del lecho predirigido 1B2/CD19 (Ejemplo 4). **FIG. 3A.** Para ensayar la especificidad de la unión del lecho de redirección 1B2/CD19 predirigido, se incubaron 0,2x10⁶ células T CD8⁺ 2C y Pmel con 50 µl de lechos a 4 °C durante la duración indicada. Después de la incubación, las células se lavaron y se contratiñeron con anti-IgG₁ de ratón PE. **FIG. 3B.** Para ensayar la estabilidad de un predireccionamiento de lechos de redirección 1B2/CD19, se tiñeron 0,2x10⁶ células T CD8⁺ 2C a 4 °C durante 15 minutos (línea más a la izquierda) con 50 µl de lechos, se lavaron y posteriormente se transfirieron a 37 °C. Después de los puntos de tiempo indicados, las células se contratiñeron con anti-IgG₁ de ratón PE para identificar los lechos no unidos. **FIG. 3C.** Impacto de la relación de lecho de redireccionamiento 1B2: células en la intensidad de la tinción. Cualquiera de diferentes cantidades de células (panel izquierdo) se predirigieron con 50 µl de lechos o 0,2x10⁶ células CD8⁺ 2C (panel derecho) se predirigieron con diferentes cantidades de lechos. El predireccionamiento se realizó a 4 °C durante 15 minutos. Las células se lavaron y se contratiñeron con anti-IgG₁ de ratón PE.

45 **FIG. 4A-B.** Direccionamiento de anticuerpo de un TCR de alta afinidad por lechos de redireccionamiento basados en anticuerpos (Ejemplo 5). **FIG. 4A.** La lisis específica redirigida de células T CD8⁺ 2C de células T2 mediada por lechos 1B2 (control) y 1B2/CD19 (redireccionamiento) se determinó mediante ensayo de liberación de ⁵¹Cr. Se comparó un protocolo de cocultivo (panel izquierdo) con un protocolo de predireccionamiento (panel derecho) a diferentes relaciones E:T. Los datos presentados representan una lisis específica, con el fondo (solo células) restado. **FIG. 4B.** Comparación de lisis específica de 1B2/CD19 usando un protocolo de cocultivo o de predireccionamiento. Los datos presentados representan la lisis por redireccionamiento específico inducida por 1B2/CD19 al que se ha restado 1B2 de las células diana T2 a diferentes relaciones E:T.

55 **FIG. 5A-B.** Inducción de muerte redirigida en células T2 mediante lechos de redireccionamiento basados en MHC-Ig predirigidas (Ejemplo 5). **FIG. 5A.** Unión de un TCR de alta afinidad en células T CD8⁺ 2C con lechos de redireccionamiento basados en L^d-QL9-Ig. Los lechos L^d-QL9-Ig y solo CD19 sirvieron como control de redireccionamiento. Los datos presentados en los gráficos de línea (panel superior) y de barras (panel inferior) representan la lisis específica de las células T2 derivadas del mismo experimento, con el fondo (solo las células) restado. **FIG. 5B.** Unión de un TCR tumoral de baja afinidad en células T CD8⁺ Pmel con lechos de redireccionamiento basados en D^b-gp100-Ig. Los lechos de solo D^b-gp100-Ig sirvieron como control de redireccionamiento. Los lechos "K^b-OVA-Ig" y "K^b-OVA-Ig/CD19" representan controles no cognados para la lisis redirigida mediada por D^b-gp100-Ig/CD19. Los datos presentados en los gráficos de línea (panel superior) y de barras (panel inferior) representan la lisis específica de las células T2 derivadas del mismo experimento, con el fondo (solo las células) restado. La lisis específica se determinó mediante un ensayo de liberación de ⁵¹Cr a las

relaciones E:T indicadas.

Descripción detallada

- 5 Los anticuerpos y las moléculas similares a los anticuerpos han surgido como una modalidad terapéutica importante clínicamente principal para el tratamiento de la autoinmunidad, la inflamación y el cáncer. Actualmente, hay más de 25 anticuerpos aprobados y cientos más en ensayos clínicos.
- 10 Los anticuerpos monoclonales (mAb) han sido el foco principal de los esfuerzos inmunoterapéuticos porque se dirigen a su antígeno específico *in vivo* con afinidades elevadas y con una especificidad superior (Köhler, G. y Milstein, C., Nature 256, 495-497, 1975). Muchos de estos mAb se han modulado para disminuir la inmunogenicidad (Isaacs, J.D.; Lancet 340, 748-752, 1992) y para aumentar la afinidad (Maynard, J. y Georgiou, G., Annu. Rev. Biomed. Eng. 2, 339-376, 2000). Sobre la base de estos avances, los mAb se han convertido en una parte esencial del régimen terapéutico para varios tipos de malignidades hematológicas, cáncer de mama y cáncer de colon (Adams, G.P., Nat. Biotechnol. 2005, 23,1147-1157; Duebel, S. Handbook of Therapeutic Antibodies; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA:Weinheim, Alemania, 2007; Weiner, LM; Lancet 2009, 373, 1033-40). Sin embargo, las tasas de respuesta a veces son bajas y la recidiva es un problema grave.
- 15
- 20 Si bien un enfoque principal de la potencia creciente ha sido aumentar la afinidad y la especificidad de los anticuerpos dirigidos, un enfoque complementario ha sido dotar a los anticuerpos con nuevas propiedades. Estos enfoques incluyen el desarrollo de inmunotoxinas, radioinmunoconjugados, inmunoglobulinas biespecíficas, anticuerpos Fv monocatenarios biespecíficos y triplecuerpos monocatenarios en tándem (Kellner, C., J. Immunother. 2008, 31, 871-884; Kugler, M., Br. J. Haematol. 2010, 150,574-586; Heiss, M.M., Int. J. Cancer 2010, 127, 2209-2221; Topp, M.S., J. Clin. Oncol. 2011, 29,2493-2498; Sebastian, M., J. Immunother. 32, 195-202, 2009).
- 25
- 30 El potencial de unir dos o más dianas simultáneamente es un concepto atractivo en la terapia del cáncer. Los compuestos biespecíficos pueden tener múltiples modos de acción que incluyen: (1) inhibición simultánea de dos receptores de la superficie celular; (2) bloqueo de dos ligandos; (3) entrecruzamiento de dos receptores; (4) administración de toxinas o agentes inductores de la muerte para matar células tumorales; y (5) reclutamiento de células T en la proximidad de células tumorales para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ("lisis redirigida") (Chan AC, Nat. Rev. Immunology 10, 301-316, mayo de 2010).
- 35 Una estrategia importante para dotar a los anticuerpos con nuevas actividades es el desarrollo de anticuerpos biespecíficos para redirigir las células T para matar las células tumorales. El formato más exitoso identificado hasta la fecha se conoce como "BiTE" (conector de células T biespecíficas). Se ha usado blinatumomab (MT103; Micromet/Medimmune), un BiTE específico para CD19 y CD3, para tratar a pacientes con linfoma no de Hodgkin.
- 40 Hasta la fecha, todos los BiTE y otros anticuerpos biespecíficos se unen a las células T mediante el uso de un componente conservado del TCR, tal como CD3. El direccionamiento de las células T de forma no específica a través de complejos conservados tales como CD3 puede producir efectos no deseados que pueden comprometer la eficacia o posiblemente dar lugar a efectos secundarios no deseados. Debido a que la mayoría de las células T son células T no efectoras, es probable que el direccionamiento no específico reclute células T irrelevantes en el sitio de interés comprometiendo la eficacia. Además de reclutar células T irrelevantes, el direccionamiento no específico puede incluso reclutar células T reguladoras y supresoras que inhiben las poblaciones de células T efectoras y, por lo tanto, limitan las respuestas efectivas de las células T antitumorales. Por tanto, existe la necesidad de terapias más efectivas y reproducibles con menos efectos secundarios.
- 45
- 50 Se pueden usar anticuerpos anti-clonotípicos, moléculas de MHC (p. ej., monómeros o multímeros de MHC de clase I, complejos de MHC de clase I-inmunoglobulina, monómeros o multímeros de MHC de clase II, complejos de MHC de clase II-inmunoglobulina) para reclutar selectivamente poblaciones de células T específicas de antígeno. La presente descripción describe el uso de dichos restos para reclutar selectivamente células T específicas de antígeno y redirigirlas para matar las células diana deseadas, mediante la coordinación de estas funciones usando una nanopartícula, y denominamos a este enfoque Redirector de células T específicas de Antígeno (ATR). Los sistemas modelo que demuestran este enfoque se describen en los ejemplos específicos, a continuación. Estos ejemplos incluyen el uso de un dímero de MHC-Ig o un mAb específico anti-TCR anti-clonotípico (1B2) unido a una nanopartícula que también comprende un anticuerpo anti-CD 19 humano para dirigirse a poblaciones de células T efectoras específicas. Estos complejos de nanopartículas (ATR, que se describen a continuación) pueden redirigir las células T citotóxicas específicas de antígeno para matar células cancerosas, incluyendo los linfomas de células B humanas. Este enfoque permite la implicación selectiva de poblaciones de células T efectoras específicas y, mediante el uso de nanopartículas, supera las limitaciones asociadas con enfoques anteriores. Además, los ATR se pueden usar en conjugación con la inmunización específica de virus para aumentar específicamente las poblaciones de efectores específicos de antígenos diana, y el sistema ATR reduccionista permite un fácil intercambio de ambas moléculas de superficie para involucrar a una población de células T efectoras diferente y/o a un tipo de célula diana diferente.
- 60
- 65 Redirectores de células T específicas de antígeno

Los "redireccionadores de células T específicas de antígeno" (ATR; también denominados en la presente memoria "lechos de redireccionamiento") son nanopartículas que comprenden (A) al menos un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno o epítipo del mismo presente en una célula diana deseada y (B) al menos un resto que se une específicamente a células T efectoras específicas de antígeno. El ATR redirige la población específica de células T efectoras a las células diana, donde las células T efectoras median la lisis de las células diana. Como se demuestra a continuación en los ejemplos específicos, los ATR muestran una exquisita funcionalidad específica de antígeno en experimentos *in vitro*. Esto es aún más sorprendente si se tiene en cuenta que estas construcciones tienen un tamaño de 50-100 nm, un tamaño que se ha considerado demasiado grande para generar suficiente contacto célula-célula para matar por redireccionamiento (James JR, Nature. 5 de julio de 2012;487(7405):64-9). Los componentes de los ATR se describen a continuación. Ventajosamente, mientras que los anticuerpos biespecíficos necesariamente tienen una relación 1:1 de sus dos restos de unión, los componentes (A) y (B) de los ATR no necesitan estar presentes en la nanopartícula en una relación 1:1. Además, como se describe a continuación, son posibles múltiples combinaciones de componentes (A) y (B). Ambas características permiten una gran flexibilidad en el diseño de los ATR para satisfacer una necesidad particular.

Un ATR también puede incluir otras moléculas que tienen un efecto biológico sobre una célula T precursora o sobre una célula T específica de antígeno ("moléculas que afectan a las células T"). Dichos efectos biológicos incluyen, por ejemplo, la diferenciación de una célula T precursora en una CTL, célula T colaboradora (p. ej., Th1, Th2) o célula T reguladora; proliferación de células T; e inducción de apoptosis de células T. Por tanto, las moléculas que afectan a las células T incluyen moléculas coestimuladoras de células T, moléculas de adhesión, factores de crecimiento de células T, moléculas inductoras de células T reguladoras y moléculas inductoras de apoptosis. En algunas realizaciones, un ATR comprende al menos una de dichas moléculas; opcionalmente, un ATR comprende al menos dos, tres o cuatro de dichas moléculas, en cualquier combinación.

Las moléculas coestimuladoras de células T contribuyen a la activación de las células T específicas de antígeno. Dichas moléculas incluyen, pero no están limitadas a, moléculas que se unen específicamente a CD28 (incluyendo anticuerpos), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), B7-H3, 4-1BBL, CD27, CD30, CD134 (OX-40L), B7h (B7RP-1), CD40, LIGHT, anticuerpos que se unen específicamente a HVEM, anticuerpos que se unen específicamente a CD40L, anticuerpos que se unen específicamente a OX40, y anticuerpos que se unen específicamente a 4-1BB.

Las moléculas de adhesión útiles para los ATR se pueden usar para mediar la adhesión del ATR a una célula T o a un precursor de la célula T. Las moléculas de adhesión útiles incluyen, por ejemplo, ICAM-1 y LFA-3.

Los factores de crecimiento de células T afectan la proliferación y/o diferenciación de las células T. Los ejemplos de factores de crecimiento de células T incluyen citoquinas (p. ej., interleuquinas, interferones) y superantígenos. Si se desea, pueden estar presentes citoquinas en complejos moleculares que comprenden proteínas de fusión. En una realización, un complejo molecular de citoquina puede comprender al menos dos proteínas de fusión: una primera proteína de fusión comprende una primera citoquina y una cadena pesada de inmunoglobulina y una segunda proteína de fusión comprende una segunda citoquina y una segunda cadena pesada de inmunoglobulina. La primera y segunda cadenas pesadas de inmunoglobulina se asocian para formar el complejo molecular de citoquina. En otra realización, un complejo molecular de citoquina comprende al menos cuatro proteínas de fusión: dos primeras proteínas de fusión comprenden (i) una cadena pesada de inmunoglobulina y (ii) una primera citoquina y dos segundas proteínas de fusión comprenden (i) una cadena ligera de inmunoglobulina y (ii) una segunda citoquina. Las dos primeras y las dos segundas proteínas de fusión se asocian para formar el complejo molecular de citoquina. La primera y la segunda citoquinas en cualquier tipo de complejo molecular de citoquina pueden ser iguales o diferentes. Las citoquinas particularmente útiles incluyen IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15 e interferón gamma.

Los superantígenos son potentes mitógenos de células T. Los superantígenos estimulan la mitogénesis de las células T al unirse primero a las moléculas de histocompatibilidad principal (MHC) de clase II y luego, como un complejo binario, se unen de manera específica para $V\beta$ al receptor de antígenos de las células T (TCR). Los superantígenos incluyen, pero no están limitados a, enterotoxinas bacterianas, tales como enterotoxinas estafilococales (p.ej., SEA y porciones activas de la misma, descritas en la Patente de EE.UU. 5.859.207; superantígenos retrovirales SEB, SEC, SED y SEE (descritos en la Patente de EE.UU. 5.519.114); exotoxina (SPE) de *Streptococcus pyogenes*, toxina del síndrome de choque tóxico (TSST-1) de *Staphylococcus aureus*, una exotoxina mitógena estreptococal (SME) y un superantígeno estreptococal (SSA) (descrito en US 2003/0039655); y superantígenos descritos en US 2003/0036644 y US 2003/0009015.

Las moléculas inductoras de células T reguladoras son moléculas que inducen la diferenciación y/o el mantenimiento de las células T reguladoras. Dichas moléculas incluyen, pero no están limitadas a, TGF β , IL-10, interferón- α e IL-15. Véanse, p. ej., US 2003/0049696, US 2002/0090724, US 2002/0090357, US 2002/0034500, y US 2003/0064067.

Las moléculas que inducen la apoptosis provocan la muerte celular. Las moléculas que inducen la apoptosis incluyen toxinas (p. ej., cadena A de ricina, exotoxinas de *Pseudomonas* mutantes, toxoide diftérico, estreptonigrina, boamicina, saporina, gelonina y proteína antiviral de fitolaca), TNF α y ligando Fas.

Nanopartículas

5 Las nanopartículas usadas en los ATR pueden estar hechas de metales tales como hierro, níquel, aluminio, cobre, cinc, cadmio, titanio, circonio, estaño, plomo, cromo, manganeso y cobalto; óxidos metálicos y óxidos hidratados tales como óxido de aluminio, óxido de cromo, óxido de hierro, óxido de zinc y óxido de cobalto; silicatos metálicos tales como de magnesio, aluminio, cinc, plomo, cromo, cobre, hierro, cobalto y níquel; aleaciones tales como bronce, latón, acero inoxidable, etc. Las nanopartículas también pueden estar hechas de materiales orgánicos o no metálicos tales como celulosa, cerámica, vidrio, nailon, poliestireno, caucho, plástico o látex. En algunas realizaciones, las nanopartículas se forman a partir de una combinación de un metal y un compuesto orgánico o no metálico, por ejemplo, metales revestidos con metacrilato o estireno y metales revestidos con silicato. El material base se puede dopar con un agente para alterar sus propiedades físicas o químicas. Por ejemplo, se pueden incluir óxidos de tierras raras en vidrios de aluminosilicato para crear materiales de vidrio paramagnéticos con alta densidad (véase White y Day, Key Engineering Materials Vol. 94-95, 181-208, 1994). Alternativamente, las nanopartículas pueden estar hechas completamente de materiales orgánicos biodegradables, tales como celulosa, dextrano y similares.

15 Las nanopartículas adecuadas disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, nanopartículas de níquel (Tipo 123, VM 63, 18/209A, 10/585A, 347355 y HDNP vendidos por Novamet Specialty Products, Inc., Wyckoff, N.J.; 08841R vendido por Spex, Inc.; 01509BW vendido por Aldrich), nanopartículas de acero inoxidable (P316L vendido por Ametek), polvo de zinc (Aldrich), nanopartículas de paladio (D13A17, John Matthey Elec.), lechos epoxi M-450 (Dynal), nanopartículas de TiO₂, SiO₂ y MnO₂ (Aldrich); y lechos recubiertos de IgG disponibles en Miltenyi Biotec.

20 La configuración de las nanopartículas puede variar de ser irregulares en forma a ser esféricas y/o de tener una superficie desigual o irregular a tener una superficie lisa. Las características preferidas de las nanopartículas se pueden seleccionar dependiendo de las condiciones particulares bajo las cuales se preparará y/o usará un ATR.

25 Las nanopartículas pueden ser de tamaño uniforme o variable. La distribución del tamaño de las partículas se puede determinar convenientemente, por ejemplo, usando dispersión dinámica de luz.

Las nanopartículas tienen un diámetro medio de partícula de 25-125 nm.

30 En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro medio de partícula de 25-26 nm, 25-27 nm, 25-28 nm, 25-29 nm, 25-30 nm, 26-27 nm, 26-28 nm, 26-29 nm, 26-30 nm, 27-28 nm, 27-29 nm, 27-30 nm, 28-29 nm, 28-30 nm o 29-30 nm.

35 En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro medio de partícula de 25-30 nm, 25-35 nm, 25-40 nm, 25-45 nm, 25-50 nm, 25-55 nm, 25-60 nm, 25-70 nm, 25-75 nm, 25-80 nm, 25-90 nm, 25-95 nm, 25-100 nm o 25-125 nm.

40 En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro medio de partícula de 30-35nm \pm 5 nm, 35-40 nm \pm 5 nm, 35-45 nm \pm 5 nm, 35-50 nm \pm 5 nm, 35-55 nm \pm 5 nm, 35-60 nm \pm 5 nm, 35-70 nm \pm 5 nm, 35-75 nm \pm 5 nm, 35-80 nm \pm 5 nm, 35-90 nm \pm 5 nm, 35-95 nm \pm 5 nm, 35-100 nm \pm 5 nm, 40-45 nm \pm 5 nm, 45-50 nm \pm 5 nm, 45-55 nm \pm 5 nm, 45-60 nm \pm 5 nm, 45-70 nm \pm 5 nm, 45-75 nm \pm 5 nm, 45-80 nm \pm 5 nm, 45-90 nm \pm 5 nm, 45-95 nm \pm 5 nm, 45-100 nm \pm 5 nm, 50-55 nm \pm 5 nm, 50-60 nm \pm 5 nm, 50-70 nm \pm 5 nm, 50-75 nm \pm 5 nm, 50-80 nm \pm 5 nm, 50-90 nm \pm 5 nm, 50-95 nm \pm 5 nm, 50-100 nm \pm 5 nm, 55-60 nm \pm 5 nm, 55-70 nm \pm 5 nm, 55-75 nm \pm 5 nm, 55-80 nm \pm 5 nm, 55-90 nm \pm 5 nm, 55-95 nm \pm 5 nm, 55-100 nm \pm 5 nm, 60-70 nm \pm 5 nm, 60-75 nm \pm 5 nm, 60-80 nm \pm 5 nm, 60-90 nm \pm 5 nm, 60-95 nm \pm 5 nm, 60-100 nm \pm 5 nm, 65-70 nm \pm 5 nm, 65-75 nm \pm 5 nm, 65-80 nm \pm 5 nm, 65-90 nm \pm 5 nm, 65-95 nm \pm 5 nm, 65-100 nm \pm 5 nm, 70-75 nm \pm 5 nm, 70-80 nm \pm 5 nm, 70-90 nm \pm 5 nm, 70-95 nm \pm 5 nm, 70-100 nm \pm 5 nm, 75-80 nm \pm 5 nm, 75-90 nm \pm 5 nm, 75-95 nm \pm 5 nm, 75-100 nm \pm 5 nm, 80-90 nm \pm 5 nm, 80-95 nm \pm 5 nm, 80-100 nm \pm 5 nm, 85-90 nm \pm 5 nm, 85-95 nm \pm 5 nm, 85-100 nm \pm 5 nm, 90-95 nm \pm 5 nm, o 90-100 nm \pm 5 nm.

50 En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro medio de partícula de 35-40 nm \pm 10 nm, 35-45 nm \pm 10 nm, 35-100 nm \pm 10 nm, 35-105 nm \pm 10 nm, 35-60 nm \pm 10 nm, 35-70 nm \pm 10 nm, 35-75 nm \pm 10 nm, 35-80 nm \pm 10 nm, 35-90 nm \pm 10 nm, 35-95 nm \pm 10 nm, 35-100 nm \pm 10 nm, 40-45 nm \pm 10 nm, 45-100 nm \pm 10 nm, 45-105 nm \pm 10 nm, 45-60 nm \pm 10 nm, 45-70 nm \pm 10 nm, 45-75 nm \pm 10 nm, 45-80 nm \pm 10 nm, 45-90 nm \pm 10 nm, 45-95 nm \pm 10 nm, 45-100 nm \pm 10 nm, 50-105 nm \pm 10 nm, 50-60 nm \pm 10 nm, 50-70 nm \pm 10 nm, 50-75 nm \pm 10 nm, 50-80 nm \pm 10 nm, 50-90 nm \pm 10 nm, 50-95 nm \pm 10 nm, 50-100 nm \pm 10 nm, 55-60 nm \pm 10 nm, 55-70 nm \pm 10 nm, 55-75 nm \pm 10 nm, 55-80 nm \pm 10 nm, 55-90 nm \pm 10 nm, 55-95 nm \pm 10 nm, 55-100 nm \pm 10 nm, 60-70 nm \pm 10 nm, 60-75 nm \pm 10 nm, 60-80 nm \pm 10 nm, 60-90 nm \pm 10 nm, 60-95 nm \pm 10 nm, 60-100 nm \pm 10 nm, 65-70 nm \pm 10 nm, 65-75 nm \pm 10 nm, 5-80 nm \pm 10 nm, 65-90 nm \pm 10 nm, 65-95 nm \pm 10 nm, 65-100 nm \pm 10 nm, 70-75 nm \pm 10 nm, 70-80 nm \pm 10 nm, 70-90 nm \pm 10 nm, 70-95 nm \pm 10 nm, 70-100 nm \pm 10 nm, 75-80 nm \pm 10 nm, 75-90 nm \pm 10 nm, 75-95 nm \pm 10 nm, 75-100 nm \pm 10 nm, 80-90 nm \pm 10 nm, 80-95 nm \pm 10 nm, 80-100 nm \pm 10 nm, 85-90 nm \pm 10 nm, 85-95 nm \pm 10 nm, 85-100 nm \pm 10 nm, 90-95 nm \pm 10 nm, o 90-100 nm \pm 10 nm.

65 En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro medio de partícula de 40-45 nm \pm 15 nm, 45-60 nm \pm 15 nm, 45-70 nm \pm 15 nm, 45-75 nm \pm 15 nm, 45-80 nm \pm 15 nm, 45-90 nm \pm 15 nm, 45-95 nm \pm 15 nm, 45-100

ES 2 820 729 T3

- nm+/-15 nm, 50-60 nm+/-15 nm, 50-70 nm+/-15 nm, 50-75 nm+/-15 nm, 50-80 nm+/-15 nm, 50-90 nm+/-15 nm, 50-95 nm+/-15 nm, 50-100 nm+/-15 nm, 55-60 nm+/-15 nm, 55-70 nm+/-15 nm, 55-75 nm+/-15 nm, 55-80 nm+/-15 nm, 55-90 nm+/-15 nm,
- 5 55-95 nm+/-15 nm, 55-100 nm+/-15 nm, 60-70 nm+/-15 nm, 60-75 nm+/-15 nm, 60-80 nm+/-15 nm, 60-90 nm+/-15 nm, 60-95 nm+/-15 nm, 60-100 nm+/-15 nm, 65-70 nm+/-15 nm, 65-75 nm+/-15 nm, 65-80 nm+/-15 nm, 65-90 nm+/-15 nm, 65-95 nm+/-15 nm, 65-100 nm+/-15 nm, 70-75 nm+/-15 nm, 70-80 nm+/-15 nm, 70-90 nm+/-15 nm, 70-95 nm+/-15 nm,
- 10 70-100 nm+/-15 nm, 75-80 nm+/-15 nm, 75-90 nm+/-15 nm, 75-95 nm+/-15 nm, 75-100 nm+/-15 nm, 80-90 nm+/-15 nm, 80-95 nm+/-15 nm, 80-100 nm+/-15 nm, 85-90 nm+/-15 nm, 85-95 nm+/-15 nm, 85-100 nm+/-15 nm, 90-95 nm+/-15 nm, o 90-100 nm+/-15 nm.
- 15 En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro medio de partícula de 45-60 nm+/-20 nm, 45-70 nm+/-20 nm, 45-75 nm+/-20 nm, 45-80 nm+/-20 nm, 45-90 nm+/-20 nm, 45-95 nm+/-20 nm, 45-100 nm+/-20 nm, 50-60 nm+/-20 nm, 50-70 nm+/-20 nm, 50-75 nm+/-20 nm, 50-80 nm+/-20 nm, 50-90 nm+/-20 nm, 50-95 nm+/-20 nm,
- 20 50-100 nm+/-20 nm, 55-60 nm+/-20 nm, 55-70 nm+/-20 nm, 55-75 nm+/-20 nm, 55-80 nm+/-20 nm, 55-90 nm+/-20 nm, 55-95 nm+/-20 nm, 55-100 nm+/-20 nm, 60-70 nm+/-20 nm, 60-75 nm+/-20 nm, 60-80 nm+/-20 nm, 60-90 nm+/-20 nm, 60-95 nm+/-20 nm, 60-100 nm+/-20 nm, 65-70 nm+/-20 nm, 65-75 nm+/-20 nm, 65-80 nm+/-20 nm, 65-90 nm+/-20 nm, 65-95 nm+/-20 nm, 65-100 nm+/-20 nm, 70-75 nm+/-20 nm, 70-80 nm+/-20 nm, 70-90 nm+/-20 nm, 70-95 nm+/-20 nm, 70-100 nm+/-20 nm, 75-80 nm+/-20 nm, 75-90 nm+/-20 nm, 75-95 nm+/-20 nm, 75-100 nm+/-20 nm,
- 25 80-90 nm+/-20 nm, 80-95 nm+/-20 nm, 80-100 nm+/-20 nm, 85-90 nm+/-20 nm, 85-95 nm+/-20 nm, 85-100 nm+/-20 nm, 90-95 nm+/-20 nm, o 90-100 nm+/-20 nm.
- 30 En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro medio de partícula de 50-60 nm+/-25 nm, 50-70 nm+/-25 nm, 50-75 nm+/-25 nm, 50-80 nm+/-25 nm, 50-90 nm+/-25 nm, 50-95 nm+/-25 nm, 50-100 nm+/-25 nm, 55-60 nm+/-25 nm, 55-70 nm+/-25 nm, 55-75 nm+/-25 nm, 55-80 nm+/-25 nm, 55-90 nm+/-25 nm, 55-95 nm+/-25 nm, 55-100 nm+/-25 nm, 60-70 nm+/-25 nm, 60-75 nm+/-25 nm, 60-80 nm+/-25 nm, 60-90 nm+/-25 nm, 60-95 nm+/-25 nm, 60-100 nm+/-25 nm, 65-70 nm+/-25 nm, 65-75 nm+/-25 nm, 65-80 nm+/-25 nm, 65-90 nm+/-25 nm, 65-95 nm+/-25 nm, 65-100 nm+/-25 nm, 70-75 nm+/-25 nm, 70-80 nm+/-25 nm, 70-90 nm+/-25 nm, 70-95 nm+/-25 nm, 70-100 nm+/-25 nm, 75-80 nm+/-25 nm, 75-90 nm+/-25 nm, 75-95 nm+/-25 nm, 75-100 nm+/-25 nm, 80-90 nm+/-25 nm, 80-95 nm+/-25 nm, 80-100 nm+/-25 nm, 85-90 nm+/-25 nm, 85-95 nm+/-25 nm, 85-100 nm+/-25 nm, 90-95 nm+/-25 nm, o 90-100 nm+/-25 nm.
- 35 En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro medio de partícula de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o 125 nm.
- 40 En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro medio de partícula de 50+/-5 nm, 75+/-5 nm, o 100+/-5 nm.
- 45 En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro medio de partícula de 50+/-10 nm, 75+/-10 nm, o 100+/-10 nm.
- 50 En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro medio de partícula de 50+/-15 nm, 75+/-15 nm, o 100+/-15 nm.
- 55 En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro medio de partícula de 50+/-20 nm, 75+/-20 nm, o 100+/-20 nm.
- 60 En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro medio de partícula de 50+/-25 nm, 75+/-25 nm, o 100+/-25 nm.
- 65 En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro medio de partícula de 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, o 125 nm.
- Las moléculas de proteína se pueden unir a nanopartículas por varios medios bien conocidos en la técnica, incluyendo adsorción y acoplamiento covalente. En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen a nanopartículas recubiertas con anticuerpos anti-inmunoglobulina (p. ej., lechos recubiertos con IgG disponibles en Miltenyi Biotec).

Anticuerpos

Los anticuerpos que se unen específicamente a antígenos o epítopos presentes en las células diana deseadas se utilizan para llevar las células T específicas de antígeno a una proximidad suficiente de las células diana para efectuar la muerte de esas células.

La unión específica se produce al antígeno o epítipo correspondiente incluso en presencia de una población heterogénea de proteínas y otros agentes biológicos. "Unión específica" de un anticuerpo significa que se une a su antígeno o epítipo diana con una afinidad que es sustancialmente mayor que la unión del anticuerpo a un antígeno o epítipo irrelevante. La diferencia relativa en la afinidad es a menudo al menos un 25 % mayor, más a menudo al menos un 50 % mayor, la mayoría de las veces al menos un 100 %. La diferencia relativa puede ser al menos 2x, al menos 5x, al menos 10x, al menos 25x, al menos 50x, al menos 100x, al menos 1.000x, por ejemplo.

Los "anticuerpos" incluyen inmunoglobulinas (p. ej., IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) y fragmentos de las mismas. Por tanto, los anticuerpos incluyen anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, y pueden ser policlonales o monoclonales. Los fragmentos de anticuerpo comprenden una o más regiones variables o de unión a antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; anticuerpos lineales; y moléculas de anticuerpos monocatenarios.

Dependiendo del tipo de anticuerpo empleado, un anticuerpo puede aislarse, prepararse sintéticamente o modificarse por ingeniería genética, todo ello utilizando técnicas bien conocidas. Véase, p.ej., US 2013/0034566 y US 2013/00289 32.

Un ATR puede dirigirse a una variedad de tipos de células diana, incluyendo las células tumorales, las células infectadas con un patógeno y las células implicadas en trastornos autoinmunes, dependiendo de la especificidad del anticuerpo en el ATR.

Antígenos asociados a tumores

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un antígeno asociado a tumor o epítipo del mismo. Los antígenos asociados a tumores incluyen antígenos tumorales únicos expresados de forma exclusiva por el tumor del que derivan, antígenos tumorales compartidos expresados en muchos tumores, pero no en tejidos adultos normales (antígenos oncofetales), y antígenos específicos del tejido expresados también por el tejido normal del que surge el tumor. Los antígenos asociados a tumores pueden ser, por ejemplo, antígenos embrionarios, antígenos con modificaciones postraduccionales anormales, antígenos de diferenciación, productos de oncogenes mutados o supresores tumorales, proteínas de fusión o proteínas oncovirales.

En la técnica se conoce una variedad de antígenos asociados a tumores y muchos de ellos se encuentran disponibles comercialmente. Los antígenos oncofetales y embrionarios incluyen antígeno carcinoembrionario y alfa-fetoproteína (habitualmente altamente expresados solo en embriones en desarrollo, pero con frecuencia altamente expresados por tumores del hígado y colon, respectivamente), MAGE-1 y MAGE-3 (expresados en melanoma, cáncer de mama, y glioma). fosfatasa alcalina de placenta, sialil-Lewis X (expresado en adenocarcinoma), CA-125 y CA-19 (expresados en tumores gastrointestinales, hepáticos y ginecológicos), TAG-72 (expresado en tumores colorrectales), glicoproteína 2 epitelial (expresada en muchos carcinomas), antígeno pancreático oncofetal, 5T4 (expresado en carcinoma gástrico), receptor de alfafetoproteína (expresado en múltiples tipos de tumor, en particular, en tumores mamarios) y M2A (expresado en neoplasia de células germinales).

Los antígenos de diferenciación asociados a tumores incluyen tirosinasa (expresada en melanomas) e inmunoglobulinas de superficie particulares (expresadas en linfomas).

Los productos de gen supresor de tumores y oncogén mutado incluyen Ras y p53, que se expresan ambos en muchos tipos de tumores, Her-2/neu (expresado en cánceres de mama y ginecológicos), EGF-R, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, producto génico del retinoblastoma, myc (asociado al cáncer de pulmón), ras, p53 no mutante asociado a tumores de mama, MAGE-1 y MAGE-3 (asociado a melanoma, cánceres de pulmón y otros cánceres).

Las proteínas de fusión incluyen BCR-ABL, que se expresa en la leucemia mieloide crónica.

Las proteínas oncovirales incluyen el VPH tipo 16, E6 y E7, que se encuentran en el carcinoma de cuello uterino.

Los antígenos específicos de tejido incluyen melanotransferrina y MUC1 (expresados en cánceres pancreático y de mama); CD10 (previamente conocido como antígeno de leucemia linfoblástica aguda común o CALLA) o inmunoglobulina de superficie (expresada en linfomas y leucemias de células B); la cadena α del receptor de IL-2, receptor de células T, CD45R, CD4⁺/CD8⁺ (expresado en linfomas y leucemias de células T); antígeno específico de próstata y fosfatasa ácida prostática (expresados en carcinoma de próstata); GP 100, MelanA/Mart-1, tirosinasa, gp75/marrón, BAGE y S-100 (expresado en melanoma); citoqueratinas (expresadas en varios carcinomas); y CD19,

CD20 y CD37 (expresados en linfoma).

5 Los antígenos asociados a tumores también incluyen antígenos de glicolípidos y glicoproteínas alterados, tales como glicoesfingolípidos que contienen ácido neurámico (p. ej., GM₂ y GD₂, expresados en melanomas y algunos tumores cerebrales); antígenos de grupos sanguíneos, particularmente antígenos T y Tn sialilados, que pueden expresarse de manera aberrante en carcinomas; y mucinas, tales como CA-125 y CA-19-9 (expresadas en carcinomas de ovario) o el MUC-1 subglicosilado (expresado en carcinomas de mama y pancreáticos).

10 Los antígenos específicos de tejido incluyen el antígeno de la membrana epitelial (expresado en carcinomas epiteliales múltiples), CYFRA 21-1 (expresado en cáncer de pulmón), Ep-CAM (expresado en pancarcinoma), CA125 (expresado en cáncer de ovario), inmunoglobulina monoclonal intacta o fragmentos de cadena ligera (expresados en mieloma) y la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana (HCG, expresada en tumores de células germinales).

15 Antígenos de patógenos

20 Los antígenos de patógenos incluyen componentes de protozoos, bacterias, hongos (tanto unicelulares como multicelulares), virus, priones, parásitos intracelulares, helmintos, y otros patógenos que pueden inducir una respuesta inmune. Los antígenos bacterianos incluyen antígenos cocos gram positivos, bacilos gram positivos, bacterias gram negativas, bacterias anaeróbicas, tales como organismos de las familias *Actinomycetaceae*, *Bacillaceae*, *Bartonellaceae*, *Bordetellae*, *Captophagaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Legionellaceae*, *Micrococcaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae*, *Pasteurellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Spirochaetaceae*, *Vibrionaceae* y organismos de los géneros *Acinetobacter*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Erysipelothrix*, *Ewingella*, *Francisella*, *Gardnerella*, *Helicobacter*, *Levinea*, *Listeria*, *Streptobacillus* y *Tropheryma*.

25 Los antígenos de agentes infecciosos protozoarios incluyen antígenos de plasmodio de malaria, especies de *Leishmania*, especies de *Trypanosoma* y especies de *Schistosoma*.

30 Los antígenos fúngicos incluyen antígenos de *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides*, *Sporothrix*, organismos del orden *Mucorales*, organismos que inducen cromomicosis y micetoma, y organismos de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* y *Malassezia*.

35 Los antígenos de priones incluyen la sialoglicoproteína PrP 27-30 de los priones que causan prurito lumbar, encefalopatías espongiformes bovinas (BSE), encefalopatías espongiformes felinas, kuru, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), enfermedad de Gerstmann-Strassler-Scheinker (GSS) e insomnio familiar fatal (FFI).

Los parásitos intracelulares de los que pueden obtenerse péptidos antigénicos incluyen, pero no están limitados a, *Chlamydiaceae*, *Mycoplasmataceae*, *Acholeplasmataceae*, *Rickettsiae*, y organismos de los géneros *Coxiella* y *Ehrlichia*.

40 Los péptidos antigénicos pueden obtenerse de helmintos, tales como nematodos, trematodos o cestodos.

45 Los antígenos peptídicos virales incluyen, pero no están limitados a, los de adenovirus, virus del herpes simple, virus del papiloma, virus respiratorio sincital, poxvirus, VIH, virus de influenza y CMV. Los antígenos peptídicos virales particularmente útiles incluyen proteínas de VIH, tales como proteínas gag de VIH (incluyendo, pero no limitado a, proteína de anclaje a membrana (MA), proteína de núcleo cápside (CA) y proteína nucleocápside (NC)), polimerasa de VIH, proteína de matriz del virus de influenza (M) y proteína de la nucleocápside del virus de influenza (NP), antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), proteína del núcleo de la hepatitis B (HBcAg), proteína de hepatitis e (HBeAg), ADN polimerasa de hepatitis B, antígenos de hepatitis C y similares.

50 Autoantígenos

55 Un "autoantígeno" es un antígeno propio de un organismo para el que el organismo produce una respuesta inmune. Los autoantígenos están implicados en enfermedades autoinmunes, tales como el síndrome de Goodpasture, esclerosis múltiple, enfermedad de Graves, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus dependiente de la insulina, artritis reumatoide, pénfigo vulgar, enfermedad de Addison, dermatitis herpetiforme, enfermedad celíaca y tiroiditis de Hashimoto.

60 Los autoantígenos relacionados con la diabetes incluyen insulina, ácido glutámico descarboxilasa (GAD) y otros autoantígenos de células del islote, p. ej., proteína tirosina fosfatasa ICA 512/IA-2, ICA12, ICA69, preproinsulina o un fragmento activo inmunológicamente de la misma (p. ej., cadena B de insulina, cadena A, péptido C o un fragmento activo inmunológicamente de la misma), HSP60, carboxipeptidasa H, periférica, gangliósidos (p. ej., GM1-2, GM3) o fragmentos activos inmunológicamente de los mismos.

65 Los autoantígenos asociados a la degeneración macular incluyen moléculas de la ruta del complemento y varios autoantígenos de RPE, coroides y retina, vitronectina, cristalina β, calreticulina, serotransferrina, queratina, piruvato carboxilasa, C1 y villina 2.

5 Otros autoantígenos incluyen nucleosomas (partículas que contienen histonas y ADN); partículas de ribonucleoproteína (RNP) (que contienen ARN y proteínas que median funciones especializadas en la partícula de RNP) y ADN bicatenario. Otros autoantígenos más incluyen la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), la glicoproteína asociada a mielina (MAG), proteína básica de mielina/oligodendrocitos (MOBP), proteína específica de oligodendrocitos (Osp), proteína básica de mielina (MBP), apoproteína proteolipídica (PLP), galactosa cerebrósido (GalC), glicolípidos, esfingolípidos, fosfolípidos, gangliósidos y otros antígenos neuronales.

10 Restos que se unen específicamente a células T específicas de antígeno

10 Los ATR usan restos que se unen específicamente a células T específicas de antígeno para capturar las células T y redirigirlas a la diana deseada, usando un anticuerpo como se ha descrito anteriormente. La "especificidad de antígeno" de las células T se refiere al hecho de que las células T son subpoblaciones, p. ej., subpoblaciones de células T citotóxicas altamente efectivas específicas para, p. ej., un antígeno viral o un antígeno de otro patógeno, o subpoblaciones de células T colaboradoras. Se pueden usar varios tipos de restos para este propósito.

15 En algunas realizaciones, el resto es un anticuerpo específico anti-TCR clonotípico, tal como un anticuerpo que se une específicamente solo a un TCR presente en una subpoblación de células T específicas de antígeno. Estas realizaciones son ventajosas porque no implican CD8.

20 En algunas realizaciones, el resto es un complejo MHC de clase I-inmunoglobulina, una molécula de MHC de clase I (p. ej., un monómero o multímero soluble), una molécula de MHC de clase II (p. ej., un monómero o multímero soluble) o un complejo MHC de clase II-inmunoglobulina. Dichos restos comprenden un péptido antigénico al que se dirige la célula T específica de antígeno. Los péptidos antigénicos útiles incluyen los de las tablas siguientes.

Antígenos EBV

Alelo HLA	Péptido 1	Péptido 2	Péptido 3	Péptido 4	Péptido 5
A0201	GLCTLVAML SEQ ID NO:5	TLDYKPLSV; SEQ ID NO:11	CLGGLLTMV; SEQ ID NO:16	YVLDHLIV; SEQ ID NO:20	LLWTLVLL; SEQ ID NO:23
A2402	RYSIFFDYM; SEQ ID NO:6	TYSAGIVQI; SEQ ID NO:12	TYPVLEEMF; SEQ ID NO:17	TYGPVFMCL; SEQ ID NO:21	DYCNVNLNKEF; SEQ ID NO:24
A0101	LLWTLVVL; SEQ ID NO:7	YSEHPTFTSQY; SEQ ID NO:13	TVCGGIMFL; SEQ ID NO:18		
A0301	RLRAEAQVK; SEQ ID NO:8	RVRAYTYSK; SEQ ID NO:14			
A1101	IVTDFSVIK; SEQ ID NO:9	AVFDRKSDAK; SEQ ID NO:15	SSCSCPLSKI; SEQ ID NO:19	ATIGTAMYK; SEQ ID NO:22	FLYALALLLL; SEQ ID NO:25
A2301	PYLFWLAAL; SEQ ID NO:10				
			A11		A24
			A2		
péptido	SEQ ID NO:	péptido	SEQ ID NO:	péptido	SEQ ID NO:
LLDFVRFMGV	26	AVFDRKSDAK	41	IYVLVMLVL	49
YLLEMLWRL	27	ILTDFSVIK	42	PYLFWLAAL	50
FLDKGTYTL	28	LPGPQVTAVLLHEES	43	PYLFWLAAL	51
ILYNGWYA	29	DEPASTEPEVHDQLL	44		
SLVIVTTFV	30	IVTDFSVIT	45		
TLFIGSHVV	31	IVTDFSVIR	46		
LMIPLINV	32	SLFDRKSDAK	47		
VLQWASLAV	33	NPTQAPVIQLVHAVY	48		
DTPLPLTIF	34				
SVRDRLARL	35				
LLVDLLWLL	36				
YLQGNWWTL	37				
YFLEILWRL	38				
LLSAWILTA	39				
ALLVLYSFA	40				

ES 2 820 729 T3

Proteínas del Ciclo Latente

Antígeno EBV	Coordenadas del Epítipo	Secuencia del Epítipo	Restricción de HLA
EBNA1	72-80 407-415 407-417 528-536 574-582	RPQKRPSCI, SEQ ID NO:52 HPVGEADYF, SEQ ID NO:53 HPVGEADYFEY, SEQ ID NO:54 IPQCRLTPL, SEQ ID NO:55 VLKDAIKDL, SEQ ID NO:56	B7 B53 B35.01 B7 A2.03
EBNA2	14-23 42-51 234-242	YHLIVDTDSL, SEQ ID NO:57 DTPLIPLTIF, SEQ ID NO:58 RPTLQPTP, SEQ ID NO:59	B38 A2/B51 B55
EBNA3A	158-166 176-184 246-253 325-333 378-387 379-387 406-414 450-458 458-466 491-499 502-510 596-604 603-611 617-625	QAKWRLQTL, SEQ ID NO:60 AYSSWMYSY, SEQ ID NO:61 RYSIFFDY, SEQ ID NO:62 FLRGRAYGL, SEQ ID NO:63 KRPIFIRRL, SEQ ID NO:64 RPIFIRRL, SEQ ID NO:65 LEKARGSTY, SEQ ID NO:66 HLAAQGMAY, SEQ ID NO:67 YPLHEQHGM, SEQ ID NO:68 VFSDGRVAC, SEQ ID NO:69 VPAPAGPIV, SEQ ID NO:70 SVRDLARL, SEQ ID NO:71 RLRAEAQVK, SEQ ID NO:72 VQPPQLTLQV, SEQ ID NO:73	B8 A30.02 A24 B8 B27 B7 B62 B35.01 A29 B7 A2 A3 B46
EBNA3B	149-157 217-225 244-254 279-287 399-408 416-424 488-496 657-666	HRCQAIRKK, SEQ ID NO:74 TYSAGIVQI, SEQ ID NO:75 RRARLSAERY, SEQ ID NO:76 VSFIEFVGW, SEQ ID NO:77 AVFDRKSDAK, SEQ ID NO:78 IVTDFSVIK, SEQ ID NO:79 AVLLHEESM, SEQ ID NO:80 VEITPYKPTW, SEQ ID NO:81	B27.05 A24.02 B27.02 B58 A11 A11 B35.01 B44
EBNA3C	163-171 213-222 249-258 258-266 271-278 281-290 284-293 285-293 335-343 343-351 881-889	EGGVGWRHW, SEQ ID NO:82 QNGALAINTF, SEQ ID NO:83 LRGKWQRRYR, SEQ ID NO:84 RRIYDLIEL, SEQ ID NO:85 HHIWQNLL, SEQ ID NO:86 EENLLDFVRF, SEQ ID NO:87 LLDFVRFMGV, SEQ ID NO:88 LDFVRFMGV, SEQ ID NO:89 KEHVIQNAF, SEQ ID NO:90 FRKAQIQGL, SEQ ID NO:91 QPRAPIRPI, SEQ ID NO:92	B44.03 B62 B27.05 B27.02/.04/.05 B39 B44.02 A2.01 B37 B44.02 B27.05 B7
EBNA-LP	284-292	SLREWLLRI, SEQ ID NO:93	A2
LMP1	38-46 72-82 125-133 159-167 166-174 375-386	FWLYIVMSD, SEQ ID NO:94 FRRDLLCPLGA, SEQ ID NO:95 YLLEMLWRL, SEQ ID NO:96 YLQQNWWTL, SEQ ID NO:97 TLLVDLLWL, SEQ ID NO:98 DPHGVPQLSYYD, SEQ ID NO:99	B40 A2 A2 A2 B51.1
LMP2	1-9 61-75 121-134 125-133 131-139 141-154 144-152 200-208	MGSLEMVPM, SEQ ID NO:100 EDPYWGNDRHSDYQ, SEQ ID NO:101 NPVCLPVIVAPYLF, SEQ ID NO:102 LPVIVAPYL, SEQ ID NO:103 PYLFWLAAI, SEQ ID NO:104 ASCFTASVSTVTA, SEQ ID NO:105 FTASVSTVV, SEQ ID NO:106 IEDPPFNSL, SEQ ID NO:107	B35.01 B53 A23 A68 B40.01

ES 2 820 729 T3

(continuación)

Antígeno EBV	Coordenadas del Epítipo	Secuencia del Epítipo	Restricción de HLA
	236-244 237-245 240-250 243-251 249-262	RRRWRRRLTV, SEQ ID NO:108 RRWRRRLTVC, SEQ ID NO:109 RRLTVCGGIMF, SEQ ID NO:110 TVCGGIMFL, SEQ ID NO:111 MFLACVLVLIVDAV, SEQ ID NO:112	B27.04 B14.02 B27 A1
	257-265 293-301 329-337 340-350 349-358 356-364 419-427 426-434 442-451 453-461 447-455	LIVDAVLQL, SEQ ID NO:113 GLGTLGAAI, SEQ ID NO:114 LLWTLVLL, SEQ ID NO:115 SSCSCPLSKI, SEQ ID NO:116 ILLARFLY, SEQ ID NO:117 FLYALALL, SEQ ID NO:118 TYGPVFMCL, SEQ ID NO:119 CLGGLLMV, SEQ ID NO:120 VMSNTLLSAW, SEQ ID NO:121 LTAGFLIFL, SEQ ID NO:122 LLSAWILTA, SEQ ID NO:123	A2 A2 A2.01 A11 A29 A2 A24 A2.01 A25 A2.06 A2

Proteínas del Ciclo Lítico

BRLF1	25-39	LVSDYCNVLNKEFT, SEQ ID NO:124	B18
	25-33	LVSDYCNVL, SEQ ID NO:125	A2.05
	28-37	DYCNVLNKEF, SEQ ID NO:126	A24
	91-99	AENAGNDAC, SEQ ID NO:127	B45
	101-115	IACPIVMRYVLDHLI, SEQ ID NO:128	A24/C2
	109-117	YVLDHLIVV, SEQ ID NO:129	A2.01
	121-135	FFIQAPSNRVMIPAT, SEQ ID NO:130	
	134-142	ATIGTAMYK, SEQ ID NO:131	A11
	145-159	KHSRVRAYTYSKVLG, SEQ ID NO:132	A3
	225-239	RALIKTLPRASYSSH, SEQ ID NO:133	A2
	393-407	ERPIFPHPSKPTFLP, SEQ ID NO:134	Cw4
	529-543	QKEEAAICGQMDLS, SEQ ID NO:135	B61
	441-455	EVCQPKRIRPFHPPG, SEQ ID NO:136	
BZLF1	52-64	LPEPLPQGQLTAY, SEQ ID NO:137	B35.08
	54-63	EPLPQOQLTAY, SEQ ID NO:138	B35.01
	81-89	APENAYQAY, SEQ ID NO:139	B35.01
	101-115	LQHYREVAA, SEQ ID NO:140	C8
	172-183	DSELEIKRYKNR, SEQ ID NO:141	B18
	186-201	RKCCRAKFKQLLQHYR, SEQ ID NO:142	C6
	190-197	RAKFKQLL, SEQ ID NO:143	B8
	209-217	SENDRLRLL, SEQ ID NO:144	B60
BMLF1	265-273	KDTWLDARM, SEQ ID NO:145	
	280-288	GLCTLVAML, SEQ ID NO:146	A2.01
	397-405	DEVEFLGHY, SEQ ID NO:147	B18
	435-444	SRLVRAILSP, SEQ ID NO:148	B14
BMRF1	20-28	CYDHAQTHL, SEQ ID NO:149	A2
	86-100	FRNLAYGRTCVLGKE, SEQ ID NO:150	C3/C10
	116-128	RPQGGSRPEFVKL, SEQ ID NO:151	B7
	208-216	TLDYKPLSV, SEQ ID NO:152	A2.01
	268-276	YRSGIIAVV, SEQ ID NO:153	C6
	268-276	YRSGIIAVV, SEQ ID NO:153	B39
	286-295	LPLDLSVILF, SEQ ID NO:154	B53
BARF0		LLWAARPRL, SEQ ID NO:155	A2
BCRF1	3-11	RRLVTLQC, SEQ ID NO:156	B27

(continuación)

BALF2	418-426	ARYAYYLQF, SEQ ID NO:157	B27
BILF2	240-248	RRRKGWIPL, SEQ ID NO:158	B27
BLLF1 (gp350)		VLQWASLAV, SEQ ID NO:159	A2
BALF4 (gp110)	276-284	FLDKGTYTL, SEQ ID NO:160	A2
		ILYNGWYA, SEQ ID NO:161	A2
		VPGETMCY, SEQ ID NO:162	B35
		APGWLIWY, SEQ ID NO:163	B35
BXLF2 (gp85)		TLFIGSHVV, SEQ ID NO:164	A2.01
		SLVIVTTFV, SEQ ID NO:165	A2.01
		LMIPLINV, SEQ ID NO:166	A2.01

Epítomos de células T CD4*

5

Antígeno EBV	Coordenadas del Epitopo	Secuencia del Epitopo	Restringido por HLA
EBNA1	71-85	RRPQKRPSICIGCKGT, SEQ ID NO:167	
	403-417	RPFHPVGEADYFEY, SEQ ID NO:168	
	429-448	VPPGAIEQGPADDPGEGPST, SEQ ID NO:169	
	434-458	IEQGPTDDPGEGPSTGPRGQGDGGR, SEQ ID NO:170	
	455-469	DGRRRKKGGWFGRRHR, SEQ ID NO:171	
	474-493	SNPKFENIAEGLRVLLARSH, SEQ ID NO:172	
	475-489	NPKFENIAEGLRALL, SEQ ID NO:173	
	479-498	ENIAEGLRVLLARSHVERTT, SEQ ID NO:174	DQ7
	481-500	IAEGLRALLARSHVERTTDE, SEQ ID NO:175	DQ2/3
	485-499	LRALLARSHVERTTD, SEQ ID NO:176	
	499-523	EEGNWWAGVFVYGGSKTSLYNLRRG, SEQ ID NO:177	DR11
	509-528	VYGGSKTSLYNLRRGTALAI, SEQ ID NO:178	DR1
	515-528	TSLYNLRRGTALAI, SEQ ID NO:179	DP3
	518-530	YNLRRGTALAI, SEQ ID NO:180	
	519-533	NLRRGTALAI, SEQ ID NO:181	
	519-543	EEGNWWAGVFVYGGSKTSLYNLRRG, SEQ ID NO:182	
	527-541	AIPQCRLTPLSRLPF, SEQ ID NO:183	DR13
	529-543	PQCRLTPLSRLPFGM, SEQ ID NO:184	DR14
	544-563	APGPGPQPLRESIVCYFM, SEQ ID NO:185	
	549-568	PQGPLRESIVCYFMVFLQT, SEQ ID NO:186	
	551-570	PGPLRESIVCYFMVFLQTHI, SEQ ID NO:187	DR1
	554-573	LRESIVCYFMVFLQTHIFAE, SEQ ID NO:188	
	554-578	LRESIVCYFMVFLQTHIFAEVLKDA, SEQ ID NO:189	
561-573	YFMVFLQTHIFAE, SEQ ID NO:190	DR11,12,13	
563-577	MVFLQTHIFAEVLKD, SEQ ID NO:191	DR15	
564-583	VFLQTHIFAEVLKDAIKDL, SEQ ID NO:192	DP5	
574-593	VLKDAIKDLVMTKPAPTCNI, SEQ ID NO:193		
	589-613	PTCNIKVTCSFDDGVDLPPWFPPM, SEQ ID NO:194	
	594-613	RVTVCSEFDDGVDLPPWFPPM, SEQ ID NO:195	
	607-619	PPWFPPMVEGAAA, SEQ ID NO:196	DQ2
EBNA2	11-30	GQTYHLIVDTLALHGGQTYH, SEQ ID NO:197	DR4
	46-65	IPLTIFVAGENTGVPPPLPPP, SEQ ID NO:198	
	131-150	MRMLWMANYIVRQSRGDRGL, SEQ ID NO:199	
	206-225	LPPATLVPPRPTRTLPP, SEQ ID NO:200	
	276-295	PRSTVFYNIPMPLPSSQL, SEQ ID NO:201	DR7,52a,52b,52c
	280-290	TVFYNIPMPL, SEQ ID NO:202	DQ2/DQ7
	301-320	PAQPPPGVINDQQLHHLPSG, SEQ ID NO:203	DR17
EBNA3A	364-383	EDLPCIVSRGGPKVKRPPIF, SEQ ID NO:204	DR15
	780-799	GPWWPEQWMFQGAPPSQGTP, SEQ ID NO:205	DR1
	649-668	QVADWRAPGVPAMQPQYF, SEQ ID NO:206	
EBNA3B			

ES 2 820 729 T3

(continuación)

Antígeno EBV	Coordenadas del Epitopo	Secuencia del Epitopo	Restringido por HLA
EBNA3C	66-80	NRGWMQRIRRRRRR, SEQ ID NO:207	
EBNA3C	66-80 100-119 141-155 386-400 401-415 546-560 586-600 626-640 649-660 741-760 916-930 961-986	NRGWMQRIRRRRRR, SEQ ID NO:208 PHDITYPYTARNIRDAACRAV, SEQ ID NO:209 ILCFVMAARQLQDI, SEQ ID NO:210 SDDELPYIDPNMEPV, SEQ ID NO:211 QQRPFVMSRVPAKK, SEQ ID NO:212 QKRAAPPTVSPSDTG, SEQ ID NO:213 PPAAGPPAAGPRILA, SEQ ID NO:214 PPVVRMFMRERQLPQ, SEQ ID NO:215 PQCFWEMRAGREITQ, SEQ ID NO:216 PAPQAPYQGYQEPPAPQAPY, SEQ ID NO:217 PSMPFASDYSQGAFT, SEQ ID NO:218 AQEILSDNSEISVFPK, SEQ ID NO:219	DR13 DQ5 DR1/DR4
LMP1	11-30 130-144 181-206	GPPRPPLGPPPLSSSIGLALL, SEQ ID NO:220 LWRLGATIWQLLAF, SEQ ID NO:221 LIWMYHHGPRHTDEHHHDDS, SEQ ID NO:222	DR7 y DR9 DR16
	206-225 211-236 212-226 340-354	QATDDSSHESDSNSNEGRHH, SEQ ID NO:223 SSHESDSNSNEGRHLLVSG, SEQ ID NO:224 SGHESDSNSNEGRHHH, SEQ ID NO:225 TDGGGGHSHDSGHGG, SEQ ID NO:226	DQ2 DQB1*0601
LMP2	73-87 149-163 169-182 189-208	DYQPLGTQDQSLYL, SEQ ID NO:227 STVVTATGLALSLL, SEQ ID NO:228 SSYAAAQRKLLTPV, SEQ ID NO:229 VTFFAICLTWRIEDPPFNSI, SEQ ID NO:230	DR4 o DR16 DRB1*0901
	194-213 224-243 385-398 419-438	ICLTWRIEDPPFNSILFALL, SEQ ID NO:231 VLVMLVLLILAYRRRWRLT, SEQ ID NO:232 STEFIPNLFCMLLL, SEQ ID NO:233 TYGPVFMSLGGLLTMVAGAV, SEQ ID NO:234	DRB1*1001 DQB1*0601

Proteínas del Ciclo Lítico

BHRF1	171-189 122-133 45-57	AGLTLSELLVICSYLFISRG, SEQ ID NO:235 PYYVVDLSVRGM, SEQ ID NO:236 TVVLRVHVLLEEI, SEQ ID NO:237	DR2 DR4 DR4
BZLF1	174-188 207-221	ELEIKRYKNRVASRK, SEQ ID NO:238 KSENDRLRLLKQM, SEQ ID NO:239	DR13 DQB1*0402
BLLF1 (gp350)	61-81 65-79 130-144 163-183	LDLFGQLTPHTKAVYQPRGA, SEQ ID NO:240 FGQLTPHTKAVYQPR, SEQ ID NO:241 VYFQDVFGTMWCHHA, SEQ ID NO:242 DNCNSTNI, SEQ ID NO:243 TAVVRAQGLDVT, SEQ ID NO:244	DRw15 DRB1*1301 DQB 1*0402 DRw11
BALF4 (gp110)	482-496 575-589	AWCLEQKRQNMVLRE, SEQ ID NO:245 DNEIFLTKKMTVCQ, SEQ ID NO:246	DPB1*1301 DRB1*0801

5

Antígenos de influenza

Inmunodominante

M1₅₈₋₆₆ GILGFVFTL; SEQ ID NO:247

10

Péptidos Subdominantes

PB1₄₁₃₋₄₂₁ NMLSTVLGV; SEQ ID NO:248
NA₂₃₁₋₂₃₉ CVNGSCFTV; SEQ ID NO:249
PA₂₂₅₋₂₃₃ SLENFRAYV; SEQ ID NO:250
NS₁₁₂₃₋₁₃₂ IMDKNIILKA; SEQ ID NO:251
NA₇₅₋₈₄ SLCPIRGWAI; SEQ ID NO:252
PA₄₆₋₅₄ FMYSDFHFI; SEQ ID NO:253

15 Antígenos del citomegalovirus (CMV)

CMVpp65 NLVPMVATV; SEQ ID NO:254

Antígenos del sarampión

Virus del sarampión	H30	LMIDRPYVL; SEQ ID NO:255
Virus del sarampión	H516	ILGQDLQYV; SEQ ID NO:256
Virus del sarampión	H576	KLWCRHFVCV; SEQ ID NO:257
Virus del sarampión	C84	KLWESPQEI; SEQ ID NO:258

5

En algunas realizaciones, el resto es un complejo de MHC de clase I-inmunoglobulina que comprende (i) una molécula de inmunoglobulina que comprende dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina; y (ii) dos moléculas de MHC de clase I, cada una de las cuales comprende una cadena α y una microglobulina β_2 . Cada cadena α comprende dominios α_1 , α_2 y α_3 , y los dominios α_1 y α_2 de cada cadena α forman una hendidura de unión de péptidos. El extremo N de cada cadena pesada de inmunoglobulina está unido al extremo N de cada dominio α_3 , y la hendidura de unión de péptidos comprende un péptido antigénico reconocido por la célula T específica de antígeno. Dichos complejos y su producción se describen en la Patente de EE.UU. 6.268.411.

10

15

En algunas realizaciones, el resto es una molécula de MHC de clase I que comprende un péptido antigénico reconocido por la célula T específica de antígeno. En algunas realizaciones, la molécula de MHC de clase I es una forma monomérica soluble. En algunas realizaciones, la molécula de MHC de clase I es una forma multimérica soluble. Véase, p. ej., la Patente de EE.UU. 7.074.905.

20

En algunas realizaciones, el resto es una molécula de MHC de clase II que comprende un péptido antigénico reconocido por la célula T específica de antígeno. En algunas realizaciones, la molécula de MHC de clase II es una forma monomérica soluble. En algunas realizaciones, la molécula de MHC de clase II es una forma multimérica soluble. Véase, p. ej., la Patente de EE.UU. 7.074.905,

25

En algunas realizaciones, el resto es un complejo de MHC de clase II-inmunoglobulina que comprende cuatro proteínas de fusión. Las dos primeras proteínas de fusión comprenden (1) una cadena pesada de inmunoglobulina y (2) un dominio extracelular de una cadena β del MHC de clase II; y dos segundas proteínas de fusión comprenden (1) una cadena ligera de inmunoglobulina y (2) un dominio extracelular de una cadena α del MHC de clase II. Las proteínas de fusión se asocian para formar el complejo molecular, que comprende dos sitios de unión de ligando, cada sitio de unión de ligando formado por los dominios extracelulares de las cadenas α y β . Dichos complejos y su producción se describen en la Patente de EE.UU. 6.015.884.

30

35

Si se desea, un ATR puede comprender varias combinaciones de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos o epitopos presentes en las células diana deseadas y restos que se unen específicamente a células T específicas de antígeno, y estos componentes pueden estar presentes en una variedad de relaciones. Por ejemplo, son posibles las siguientes realizaciones.

40

1. En algunas realizaciones, un ATR comprende un primer anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno o primer epítipo presente en una célula diana deseada.

2. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 1 y comprende un segundo anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno o segundo epítipo presente en una célula diana deseada, en donde el primer antígeno o primer epítipo es diferente del segundo antígeno o segundo epítipo.

45

3. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 1 o 2 y comprende un primer anticuerpo específico anti-TCR clonotípico.

4. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 1, 2 o 3 y comprende un segundo anticuerpo específico anti-TCR clonotípico.

50

5. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 1, 2, 3 o 4 y comprende un primer complejo MHC-Ig que comprende un primer péptido antigénico.

55

6. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 1, 2, 3, 4 o 5 y comprende un segundo complejo MHC-Ig que comprende un segundo péptido antigénico, en donde el segundo péptido antigénico es diferente del primer péptido antigénico.

7. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 6 y comprende una primera molécula de MHC de clase I monomérica que comprende un tercer péptido antigénico.

60

8. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 7 en el que el tercer péptido antigénico es el mismo que el primer péptido antigénico de la realización 5.

9. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 7 en el que el tercer péptido antigénico es diferente del primer péptido antigénico de la realización 5.
- 5 10. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 8 o 9 y comprende una segunda molécula de MHC de clase I monomérica que comprende un cuarto péptido antigénico.
11. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 10 en el que el cuarto péptido antigénico es el mismo que el tercer péptido antigénico de la realización 7.
- 10 12. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 10 en el que el cuarto péptido antigénico es diferente del tercer péptido antigénico de la realización 7.
13. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 11 o 12 y comprende una primera molécula de MHC de clase I multimérica que comprende un quinto péptido antigénico.
- 15 14. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 13 en el que el quinto péptido antigénico es el mismo que el cuarto péptido antigénico de la realización 10.
- 20 15. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 13 en el que el quinto péptido antigénico es diferente del cuarto péptido antigénico de la realización 10.
16. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 14 o 15 y comprende una segunda molécula de MHC de clase I multimérica que comprende un sexto péptido antigénico.
- 25 17. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 16 en el que el sexto péptido antigénico es el mismo que el quinto péptido antigénico de la realización 13.
18. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 16 en el que el sexto péptido antigénico es diferente del quinto péptido antigénico de la realización 13.
- 30 19. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 17 o 18 y comprende una primera molécula de MHC de clase II monomérica que comprende un séptimo péptido antigénico.
- 35 20. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 19 en el que el séptimo péptido antigénico es el mismo que el sexto péptido antigénico de la realización 16.
21. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 19 en el que el séptimo péptido antigénico es diferente del sexto péptido antigénico de la realización 16.
- 40 22. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 20 o 21 que comprende una segunda molécula de MHC de clase II monomérica que comprende un octavo péptido antigénico.
23. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 22 en el que el octavo péptido antigénico es el mismo que el séptimo péptido antigénico de la realización 19.
- 45 24. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 22 en el que el octavo péptido antigénico es diferente del séptimo péptido antigénico de la realización 19.
- 50 25. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 23 o 24 que comprende una primera molécula de MHC de clase II multimérica que comprende un noveno péptido antigénico.
26. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 25 en el que el noveno péptido antigénico es el mismo que el octavo péptido antigénico de la realización 22.
- 55 27. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 25 en el que el noveno péptido antigénico es diferente del octavo péptido antigénico de la realización 22.
28. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 26 o 27 que comprende un primer complejo de MHC de clase II inmunoglobulina que comprende un décimo péptido antigénico.
- 60 29. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 28 en el que el décimo péptido antigénico es el mismo que el noveno péptido antigénico de la realización 25.
- 65 30. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 28 en el que el décimo péptido antigénico es diferente del noveno péptido antigénico de la realización 25.

31. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 29 o 30 que comprende un segundo complejo de MHC de clase II inmunoglobulina que comprende un undécimo péptido antigénico.

5 32. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 31 en el que el undécimo péptido antigénico es el mismo que el décimo péptido antigénico de la realización 28.

33. En algunas realizaciones, el ATR es un ATR de la realización 31 en el que el undécimo péptido antigénico es el mismo que el décimo péptido antigénico de la realización 28.

10

Proteínas de fusión de redireccionamiento

También es posible usar proteínas de fusión que comprenden (A) un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno o epítipo del mismo presente en una célula diana deseada y (B) un resto que se une específicamente a células T efectoras específicas de antígeno para redirigir a la población de células T efectoras específicas a las células diana ("proteínas de fusión de redireccionamiento"); es decir, estas proteínas de fusión funcionan como ATR pero sin el uso de un sustrato de nanopartículas. Las proteínas de fusión de redireccionamiento usan los mismos componentes descritos anteriormente para (A) y (B) y se pueden preparar usando técnicas rutinarias bien conocidas en la técnica, incluyendo la producción recombinante y la producción mediante síntesis química.

15

20

Composiciones

Las composiciones que comprenden los ATR y/o las proteínas de fusión de redireccionamiento son típicamente composiciones líquidas que contienen, p. ej., agua, disolución salina, glicerol u otros componentes líquidos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichos vehículos incluyen, pero no se limitan a, macromoléculas grandes de metabolización lenta, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas virales inactivas. En las composiciones también pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales minerales tales como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos o sulfatos, así como sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos o benzoatos. Las composiciones también pueden contener, p. ej., agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes tamponadores del pH y similares.

25

30

Métodos de tratamiento

35

Los ATR y/o las proteínas de fusión de redireccionamiento pueden usarse para tratar pacientes con tumores, p. ej., cáncer, enfermedades infecciosas o trastornos autoinmunes.

Puede tomarse como diana cualquier célula tumoral que porte un antígeno específico de tumor o un epítipo del mismo. Así, los cánceres que pueden tratarse incluyen melanoma, carcinomas, p.ej., de colon, duodenal, de próstata, de mama, de ovario, ductal, hepático, pancreático, renal, endometrial, de estómago, de mucosa oral displásica, poliposis, cáncer oral invasivo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma urinario de células transicionales y escamosas etc.; malignidades neurológicas, p.ej., neuroblastoma, gliomas, etc.; malignidades hematológicas, p.ej., leucemia mielógena crónica, leucemia aguda de la infancia, linfomas no de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, células T cutáneo maligno, micosis fungoides, linfoma de células T cutáneo no MF, papulosis linfomatoide, hiperplasia linfoide cutánea rica en células T, pénfigo ampolloso, y lupus eritematoso discoide.

40

45

Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse incluyen las provocadas por bacterias, virus, priones, hongos, parásitos, helmintos, etc. Dichas enfermedades incluyen SIDA, hepatitis, infección por CMV y enfermedad linfoproliferativa postrasplante (PTLD). Por ejemplo, el CMV es el patógeno viral más común encontrado en pacientes con trasplante de órganos y es una de las causas principales de morbilidad y mortalidad en pacientes que reciben trasplantes de células madre de sangre periférica o médula ósea (Zaia, Hematol. Oncol. Clin. North Am. 4, 603-23, 1990). Esto se debe al estado inmunocomprometido de estos pacientes, lo que permite la reactivación del virus latente en pacientes seropositivos o la infección oportunista en individuos seronegativos. El tratamiento actual se centra en el uso de compuestos antivirales tales como ganciclovir, que tiene desventajas, siendo la más significativa el desarrollo de CMV resistente a fármacos. Los TCRB proporcionan una alternativa útil a estos tratamientos.

50

55

La enfermedad linfoproliferativa postrasplante (PTLD) ocurre en una fracción significativa de pacientes sometidos a trasplante y se produce como consecuencia de la infección por el virus de Epstein-Barr (EBV). Se cree que aproximadamente el 90 % de la población adulta de los Estados Unidos presenta infección por EBV (Anagnostopoulos y Hummel, Histopathology 29, 297-315, 1996). El sistema inmune mantiene la replicación y la infección viral activas bajo control, pero, como en los casos de CMV, los individuos inmunocomprometidos por terapias de trasplante pierden las poblaciones de las células T de control, lo que permite la reactivación viral. Esto representa un impedimento importante para los protocolos de trasplante. El EBV también puede estar involucrado en la promoción tumoral en una variedad de cánceres hematológicos y no hematológicos. Además, existe una fuerte asociación entre el EBV y los carcinomas nasofaríngeos. Por lo tanto, el tratamiento con los TCRB ofrece una alternativa excelente a las terapias

60

65

actuales.

Los trastornos autoinmunes que pueden tratarse incluyen el síndrome de Goodpasture, esclerosis múltiple, enfermedad de Graves, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus dependiente de la insulina, artritis reumatoide, pénfigo vulgar, enfermedad de Addison, dermatitis herpetiforme, enfermedad celíaca y tiroiditis de Hashimoto.

En algunas realizaciones, los ATR y/o las proteínas de fusión de redireccionamiento se preparan y administran directamente al paciente. En algunas realizaciones, los linfocitos T se extraen de un paciente y se ponen en contacto con los ATR y/o las proteínas de fusión de redireccionamiento para expandir una población específica de antígeno de células T citotóxicas. Las células T citotóxicas y los ATR y/o las proteínas de fusión de redireccionamiento se administran entonces al paciente. Opcionalmente, con cualquiera de los enfoques, el paciente puede vacunarse frente al antígeno al que se dirige el lecho de redireccionamiento de las células T.

Las rutas de administración incluyen la administración intravenosa, intraperitoneal y subcutánea.

Dosis

Una dosis terapéuticamente efectiva de los ATR y/o las proteínas de fusión de redireccionamiento es aquella que producirá un efecto deseado en el paciente, p. ej., el alivio de algún síntoma asociado con la enfermedad que se está tratando, tal como el encogimiento del tumor. Las dosificaciones particulares de los ATR y/o de las proteínas de fusión de redireccionamiento empleadas para un método de tratamiento en particular variará según la afección que se esté tratando, la afinidad de unión del anticuerpo por su diana, el grado de progresión de la enfermedad, etc. Por ejemplo, la dosis y el esquema real pueden variar dependiendo de si las composiciones se administran en combinación con otras composiciones farmacéuticas, o dependiendo de las diferencias individuales en farmacocinética, disposición del fármaco y metabolismo. Un experto en la técnica puede realizar fácilmente cualquier ajuste necesario según las necesidades de la situación particular.

En algunas realizaciones, los ATR se administran a pacientes en dosis que varían de aproximadamente 0,5-2,5mg de ATR/kg de peso corporal ($\sim 1,1 \times 10^{13}$ ATR); p.ej., 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 ATR/kg. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión de redireccionamiento se administran a pacientes en dosis que varían de aproximadamente 1 μ g/kg a 100 mg/kg (p.ej., de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg; 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, o 10 mg/kg o cualquier combinación de las mismas).

Modelos animales

Se encuentran disponibles varios modelos murinos para evaluar los protocolos de inmunoterapia para el tratamiento de tumores. Dos modelos son especialmente adecuados para evaluar el tratamiento del melanoma. Un modelo usa ratones humanos/SCID que portan una línea de melanoma humano implantada subcutáneamente, tal como BML. En dichos modelos, la transferencia de CTL específicos de Mart-1 expandidos *ex vivo* retrasa el inicio y/o crecimiento del tumor. Un segundo modelo usa los ratones transgénicos A2 murinos y el melanoma B16 murino que ha sido transfectado con una molécula similar a HLA-A2, llamada AAD. Esta molécula, que también es la base del transgénico A2, es el HLA-A2 humano en dominios alfa 1-2 fusionados con el dominio alfa3 murino. Usando estos ratones transgénicos, el melanoma murino B16-AAD es sensible al rechazo a través de epítomos de melanoma restringidos a A2 bien definidos derivados de tirosinasa y gp100.

Kits

Los ATR y/o las proteínas de fusión de redireccionamiento pueden proporcionarse en kits. Los contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, y tubos de ensayo. Los contenedores pueden estar formados de una variedad de materiales, incluyendo vidrio o plástico. Un contenedor puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tenga un tapón que pueda perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica).

Un kit también puede comprender un segundo contenedor que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como disolución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer o disolución de dextrosa. También puede contener otros materiales útiles para un usuario final, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas. Un kit también puede comprender un segundo o tercer contenedor con otro agente activo, por ejemplo, un agente quimioterapéutico o un agente antiinfeccioso.

Los kits también pueden contener reactivos para evaluar el grado y la eficacia de células T específicas de antígeno, tales como anticuerpos frente a proteínas marcadoras específicas.

Un kit también puede comprender un prospecto que contiene instrucciones escritas para los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria. El prospecto puede ser un prospecto preliminar no aprobado o puede ser un prospecto aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) u otro organismo regulador.

Puede obtenerse una comprensión más completa haciendo referencia a los siguientes ejemplos específicos, que se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

5 Ejemplo 1

Materiales y métodos

10 i. Ratones y reactivos

10 Los ratones transgénicos 2C TCR Rag^{-/-} se mantuvieron como heterocigotos mediante la reproducción en un fondo C57/BL6. Los ratones transgénicos Pmel TCR/Thy1^a Rag^{-/-} fueron un regalo de Nicholas Restive (Institutos Nacionales de Salud (NIH), Bethesda, MD) y se mantuvieron como homocigotos. Todos los ratones se mantuvieron según la Junta de Revisión Institucional de la Universidad Johns Hopkins. Los péptidos "SIY" (SIYRYGL, SEQ ID NO:1), "SIIN" (SIINFEKL, SEQ ID NO:2), "QL9" (QLSPFPFDL, SEQ ID NO:3) y "GP100" (KVPRNQDWL, SEQ ID NO:4) se adquirieron en GenScript (Piscataway, NJ).

ii. Células

20 Las células CD8⁺ se aislaron de bazos de ratón homogeneizados después de la depleción de los glóbulos rojos mediante lisis hipotónica usando un kit de aislamiento de CD8⁺ de ratón (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante. Se sembraron en placas 1x10⁶ células CD8⁺ en una placa con fondo en U de 96 pocillos y se cocultivaron durante 7 días a una relación 1:1 con lechos cargados cognados en medio RPMI completo suplementado con factor de células T (Durai, Cancer Immunol. Immunother., 58, 2009, p. 209-220). El día 7, las células se recogieron y los lechos se retiraron. Se realizó una centrifugación en gradiente de densidad para asegurar una viabilidad de >95 %.

Las células T2 humanas (HLA-A*0201) se obtuvieron de la ATCC y se cultivaron en medio RPMI completo. Dos días antes de su uso, las células se dividieron 1:10 para lograr la máxima viabilidad. La viabilidad se determinó mediante exclusión de azul de Tripán.

30 iii. Preparación de dímeros de MHC-Ig

Los dímeros de MHC-Ig solubles, K^b-Ig, L^d-Ig y D^b-Ig, se cargaron con péptido como se describió previamente (Dal Porto, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1993, p. 6671-75). Brevemente, las moléculas de dímero se cargaron con péptido por remoción en condiciones alcalinas (pH 11,5) o ligeramente ácidas (pH 6,5), después se volvieron a plegar en presencia de un exceso de 40 veces del péptido y un exceso molar de dos veces de β₂-microglobulina humana (Lebowitz, Cell. Immunol., 192, 1999), p. 175-84). A no ser que se indique otra cosa, "K^b-SIY", "K^b-SIIN", "L^d-QL9" y "D^b-gp100" se refieren al reactivo dímero MHC-Ig unido a nanolechos cargado con el péptido indicado.

40 iv. Preparación de los lechos

Se transfirieron 100 μl de microlechos de anti-IgG₁ de ratón ("lechos;" Miltenyi Biotec) a un vial de vidrio estéril. Se añadieron 5 μg de 1B2 (un mAAb específico anti-TCR 2C clonotípico; isotipo IgG₁ de ratón) o 5 μg de MHC-Ig cargado con péptido (K^b-SIY, K^b-SIIN, L^d-QL9 o D^b-gp100). Cada lecho de redireccionamiento recibió 5 μg adicionales de un mAAb anti-CD19 humano (clon HIB19, BD, Mountain View, CA). Todos los lechos control se prepararon con 5 μg de una única molécula o anticuerpo. Para permitir la unión, los lechos se incubaron a 4 °C durante al menos 1 hora. A continuación, los lechos se lavaron 3 veces con 1 ml de PBS usando una columna MS (Miltenyi Biotec) y se eluyeron en 1 ml de PBS en un nuevo vial de vidrio, lo que dio como resultado una dilución 1/10 de la concentración de stock original. La unión de MHC-Ig y anticuerpos a lechos se analizó mediante tinción citométrica de flujo de células portadoras de diana.

v. Tinción de lechos y citometría de flujo

55 A no ser que se indique otra cosa, se incubaron 0,2x10⁶ células se incubaron con 50μl de lechos a 4 °C durante 45 minutos. A continuación, las células se lavaron con 10 volúmenes de PBS. Para detectar la unión específica de los lechos a las células, las células marcadas con lechos se tiñeron secundariamente con una dilución 1:200 de mAAb-PE de α-IgG1 de ratón (Invitrogen) a 4 °C durante 10 a 15 minutos. Todos los análisis de FACS se llevaron a cabo en un FACSCALIBUR™ (BD Biosciences, Mountain View, CA) y se analizaron usando el software FlowJo (Treestar, Ashland, OR).

60 vi. Ensayo de conjugación

65 Las células diana T2 y las células efectoras CD8⁺ activadas se tiñeron como se ha publicado anteriormente (Schütz C, J. Immunol. Methods. 2009;344(2):98-108) con PKH67 y PKH26 2 μM (Sigma, St. Louis, MO), respectivamente. Se cocultivaron 0,1x10⁶ células diana a una relación 1:1 con células efectoras CD8⁺ en 80 μl de PBS suplementado con suero de ternera fetal al 10 % y se sembraron en una placa con fondo en U de 96 pocillos. A no ser que se indique

otra cosa, se añadieron 50 µl de lechos a cada muestra y se incubó toda la noche (18-24 h) a 4 °C (protocolo de cocultivo). Al día siguiente, las muestras se analizaron mediante citometría de flujo, sin lavar y con mínima agitación. La cantidad de formación de conjugado (es decir, lechos unidos tanto a las células efectoras como a las dianas) se determinó mediante la activación de las células PKH67 y PKH26 doble positivas.

5 vii. Protocolo de predireccionamiento

10 En comparación con el protocolo de cocultivo, las células efectoras CD8⁺ (0,2x10⁶) se incubaron en primer lugar con lechos a 4 °C durante 15 - 45 minutos. Posteriormente, las células se lavaron con 10 volúmenes de PBS para eliminar todos los lechos no unidos y se resuspendieron en medios de cocultivo. Las células efectoras CD8⁺ predireccionadas se usaron dentro de la siguiente hora y la unión se evaluó mediante tinción antes de cada configuración experimental, como se ha descrito anteriormente.

15 viii. Ensayo de muerte por redireccionamiento *in vitro*

La actividad citotóxica de las células CD8⁺ redirigidas se midió mediante un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 18-20 horas usando cultivos por triplicado en placas de fondo en V. Se pulsaron 0,2x10⁶ células diana T2/placa con 200 µCi de ⁵¹Cr a 37 °C durante 1 hora. Las relaciones E:T fueron 1:2, 1:1, 2:1, 5:1 y 10:1 en 2.000 células diana/pocillo. Para permitir un contacto celular apropiado, las placas se centrifugaron (300xg, 5 minutos) justo antes de la incubación. Se promediaron los recuentos de pocillos por triplicado y se calculó el porcentaje de citotoxicidad específica como [(cpm de muestra - cpm de liberación espontánea) x100 / (cpm de liberación máxima - cpm de liberación espontánea)]. Para la liberación espontánea, las células diana se sembraron sin células CD8⁺ en medio RPMI completo. Para la liberación máxima, las células diana se sembraron en placas con TRITON™ X-100 al 0,15 % (Sigma, St. Louis, MO). Para el análisis de las propiedades de redireccionamiento mediadas por lechos, se ejecutaron simultáneamente el protocolo estándar y el protocolo de predireccionamiento.

Ejemplo 2

30 Generación de lechos de redireccionamiento basados en nanolechos funcionales

El contacto estrecho célula-célula es importante para una muerte efectiva y específica. Ensayamos lechos de 50-100 nm de tamaño para determinar la capacidad de lograr suficiente aposición de membrana de célula-célula. Los lechos se recubrieron con diferentes complejos de direccionamiento de células T, ya sea un complejo MHC-Ig o un complejo de anticuerpos anti-clonotípicos (**FIG. 1A**). Ambos conjuntos de lechos se hicieron revistiendo simultáneamente con un anti-CD 19 humano para tomar como diana las células B humanas. Tanto el anticuerpo anti-TCR clonotípico como el complejo MHC-Ig se acoplan a la célula TCR 2C, que es una célula T CD8⁺ aloespecífica transgénica modelo.

40 Para evaluar la unión efectiva de los lechos de redireccionamiento a sus dianas, se incubaron células efectoras 2C (**FIG. 1B**, panel superior) o células diana T2 (**FIG. 1B**, panel inferior) con lechos de redireccionamiento, se lavaron exhaustivamente y se tiñeron con un mAb anti-IgG₁ de ratón-PE. El anticuerpo mAb anti-IgG₁ de ratón-PE es específico para la porción Fc de todas las moléculas en los lechos de redireccionamiento y, por tanto, pudimos visualizar los lechos de redireccionamiento unidos a las células. Los datos se analizaron por citometría de flujo.

45 Lechos específicos anti-CD19 (1B2/CD19 y MHC-Ig/CD19) unidos a las células T2 (**FIG. 1B** panel inferior). Lechos que contienen ligandos específicos de TCR (lechos 1B2, 1B2/CD19, MHC-Ig y MHC-Ig/CD19) unidos a células 2C. Estos datos indican que se pueden generar lechos recubiertos con anticuerpo (mAb 1B2) y MHC-Ig (SIY-Kb-Ig) y que son capaces de tomar como diana específicamente las células 2C y las células T2 simultáneamente.

50 Ejemplo 3

Los lechos de redireccionamiento inducen conjugados de efector específico de antígeno/células diana

55 Se usó un ensayo de conjugación basado en citometría de flujo para investigar si los lechos de redireccionamiento son capaces de acercar una célula efectora específica a la proximidad de una célula diana (Schütz C, J. Immunol. Methods. 2009;344(2):98-108). Las células efectoras 2C se tiñeron con un tinte de membrana fluorescente rojo (PKH26) y las células diana T2 se tiñeron con un tinte de membrana fluorescente verde (PKH67). El uso de diferentes tintes de membrana para dos poblaciones de células diferentes permitió la discriminación específica del tipo de célula después del cocultivo con o sin lechos control o de redireccionamiento. Los cocultivos con lechos de redireccionamiento deben mostrar una mayor formación del conjugado 2C/T2, representada por una población aumentada de células dobles positivas para PKH26 (rojo) y PKH67 (verde) (esquema, **FIG. 2A**).

65 Como se muestra en la FIG. 2B, en presencia del lecho de redireccionamiento (1B2/CD19), los cocultivos tenían cantidades incrementadas (19,5 %, **FIG. 2B**) de conjugados de células doble positivas para PKH26/67, mientras todos los lechos control (1B2, CD19, control) mostraron solo formación de conjugados de fondo (6,06 - 7,21 %, **FIG. 2B**), que no superaba significativamente los niveles de conjugados en las muestras sin lechos (5,92 % solo células, **FIG.**

2B). Un resumen del ensayo de formación de conjugados muestra que la formación del conjugado 2C/T2 (PKH26/67) es altamente significativa ($p < 0,001$) en presencia de lechos de redireccionamiento en comparación con los controles (FIG. 2C). Mientras que los lechos de redireccionamiento basados tanto en anticuerpo (1B2/CD19) como en dímero (Kb-SIY-Ig) indujeron la formación de conjugados, los lechos de redireccionamiento preparados con un resto de direccionamiento de células T irrelevantes, Kb-SIIN-Ig, no mostraron una población de dobles positivos PKH26/67 incrementada (datos no mostrados).

Ejemplo 4

10 Especificidad, estabilidad y dependencia de la relación de la unión de lecho a célula diana

Para establecer un protocolo óptimo para un ensayo de muerte posterior, inicialmente investigamos las condiciones de unión de los lechos a las células. En primer lugar, verificamos la especificidad de una tinción de lechos de células efectoras y determinamos el tiempo de tinción mínimo que dio como resultado un recubrimiento suficiente de las células efectoras con los lechos (FIG. 3A). Las células 2C se incubaron con 50 μ l de lechos control o 1B2/CD19. Después de diferentes puntos de tiempo (5, 15, 30 y 60 min), las células se tiñeron secundariamente con anti-IgG₁ de ratón para determinar la cantidad de lechos unidos. Si bien no se detectó unión en ningún punto de tiempo cuando se tiñeron con los lechos control (FIG. 3A, panel izquierdo), se detectó una buena unión en células 2C incubadas con lechos 1B2/CD19 (FIG. 3A, panel derecho). Quince minutos fue un intervalo de tinción óptimo, y la intensidad de MFI se incrementó sólo mínimamente en puntos de tiempo posteriores. Además, la tinción de células T efectoras CD8+ Pmel transgénicas, específicas del antígeno tumoral gp-100, con lechos 1B2/CD19 (FIG. 3A, panel central) no mostró ninguna unión. Este hallazgo está en consonancia con el hecho de que 1B2 detecta solo el receptor de células T transgénicas (TCR) de las células 2C. Los experimentos que usaron lechos de redireccionamiento Kb-SIY-Ig y Kb-OVA-Ig también mostraron unión específica de antígeno a células efectoras 2C (datos no mostrados).

A continuación, investigamos la estabilidad de la interacción entre el lecho y la célula efectora. Las células efectoras 2C se tiñeron eficazmente con 50 μ l de lechos de redireccionamiento 1B2/CD19 (FIG. 3B, línea más a la izquierda) y todos los lechos en exceso se retiraron por lavado. La tinción se verificó mediante tinción secundaria con anti-IgG₁ de ratón. Las células 2C recubiertas con lechos se transfirieron entonces a 37 °C para determinar si puede producirse un direccionamiento suficiente de las células T2 diana en un ensayo de muerte posterior. Después de diferentes puntos de tiempo (FIG. 3B), las células 2C recubiertas con lechos de redireccionamiento se tiñeron de forma secundaria con anti-IgG₁ de ratón y se analizaron para determinar la disminución de MFI similar a la pérdida de lechos en las células 2C efectoras. Conjuntamente, estos datos indican que la tinción con lechos de redireccionamiento de las células efectoras 2C es al menos estable durante 60 minutos cuando se incuban a 37 °C. Esto representa un intervalo de tiempo suficiente como para proporcionar una interacción entre el efector y la célula diana en un ensayo de muerte posterior.

Finalmente, examinamos cómo la variación de la relación entre lechos y células puede interferir con un resultado de tinción óptimo. Incubamos las cantidades indicadas de células efectoras 2C (FIG. 3C, panel izquierdo) con lechos 1B2 a 4 °C durante 15 minutos, las lavamos y, de forma secundaria, las teñimos con anti-IgG₁ de ratón. La mejor tinción se consiguió usando 0,2x10⁶ células; sin embargo, las cantidades más altas de células no se correlacionaron con una reducción dramática en la intensidad de la tinción. De otro modo, cuando las cantidades de lechos se variaron como se indica (FIG. 3C, panel derecho), sólo 0,2x10⁶ células 2C teñidas con 50 μ l de lechos 1B2 presentaron una eficiencia de tinción prominente. Todas las demás cantidades de lechos (5 y 0,5 μ l) redujeron significativamente la intensidad de la tinción.

Ejemplo 5

50 Los lechos de redireccionamiento facilitan la lisis mediada por 2C de las células T2 humanas

Para investigar si los lechos de redireccionamiento podrían facilitar la muerte redirigida de células diana humanas mediante CTL efectoras de ratón, desarrollamos dos enfoques para estudiar la lisis redirigida. En el primer enfoque, incubamos lechos de redireccionamiento con células diana y efectoras durante el transcurso del ensayo de muerte; esto se refiere como el "enfoque de cocultivo". Este enfoque mimetiza la inyección intravenosa directa de lechos de redireccionamiento.

También desarrollamos un "ensayo de predireccionamiento". En este ensayo, las células efectoras se incubaron inicialmente con lechos de redireccionamiento para diferentes cantidades y tiempo, después se lavaron para eliminar los lechos libres. Se añadieron células diana marcadas con cromo y se monitorizó su lisis. Este enfoque mimetiza la generación *ex vivo* de células efectoras y la posterior transferencia adoptiva después del "redireccionamiento".

Los lechos de redireccionamiento fueron capaces de facilitar la lisis de las células diana usando los enfoques de cocultivo o de predireccionamiento. En el sistema de cocultivo, los lechos de redireccionamiento 1B2/CD19 facilitaron el reconocimiento de las células diana T2 en todo el rango de relaciones de células Efectoras:Diana (E:T) ensayadas (FIG. 4A, panel izquierdo). En el ensayo de cocultivo, el aumento de células efectoras se asoció con un aumento de la muerte de fondo. Por lo tanto, la ventana de lisis específica de redireccionamiento (la diferencia entre la muerte

inducida por lechos 1B2/CD19 y 1B2) de alrededor del 30 % (1:1), 20 % (2:1) y solo del 10 % (5:1) al aumentar las relaciones de E:T.

5 Las células efectoras predirigidas presentaron una muerte global más baja, pero también un fondo de lechos 1B2 más bajo y una lisis por redireccionamiento específica 1B2/CD19 estable de aproximadamente el 20-25 %. (**FIG. 4A**, panel derecho). Globalmente, este protocolo parecía más fiable y estable en términos de eficiencia mediando consistentemente aproximadamente un 20 % de lisis específica (**FIG. 4B**). Un hallazgo notable de este enfoque basado en lechos son las relaciones relativamente bajas de E:T que ya muestran una lisis por redireccionamiento efectiva en comparación con otros enfoques reportados.

10 Investigamos además la muerte de las células diana usando lechos de redireccionamiento preparados con MHC-Ig. Los lechos de redireccionamiento preparados con Ld-QL9-Ig/CD19, un complejo MHC-Ig específico para las células T CD8+ 2C, indujo hasta un 20 % (10:1) de lisis en un ensayo predirigido. Solo se detectaron cantidades de fondo de muerte inespecífica en las muestras de lechos de Ld-QL9-Ig, y no se detectó lisis en las muestras de lechos control de CD19. Esto da como resultado una ventana específica de lisis de redireccionamiento de hasta el 15 %. Globalmente, 15 la participación de un TCR tumoral de baja afinidad en células Pmel CD8+ por los lechos de redireccionamiento Db-gp100-Ig/CD19 mostró una lisis más alta de hasta un 40 % (10:1), pero la ventana de lisis específica de redireccionamiento se redujo significativamente (a solo el 5 %) debido a una alta lisis de fondo específica de los lechos control de Db-gp100-Ig (**FIG. 5B**). Los lechos de Kb-OVA-Ig cargados no cognados no mostraron ninguna lisis. 20 Conjuntamente, estos datos demuestran que los lechos de redireccionamiento basados en dímeros son capaces de inducir una lisis específica redirigida en una línea celular de linfoma de células B CD19+ humano (T2).

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula que comprende en su superficie:

5 (A) un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de célula diana o epítipo del mismo; y
(B) un resto que se une a una célula T específica de antígeno, en donde el resto se selecciona del grupo que consiste en:

- 10 (a) un anticuerpo específico anti-TCR clonotípico;
(b) una molécula de MHC de clase I monomérica que comprende un antígeno peptídico reconocido por la célula T específica de antígeno;
(c) una molécula de MHC de clase I multimérica que comprende un antígeno peptídico reconocido por la célula T específica de antígeno;
15 (d) una molécula de MHC de clase II monomérica que comprende un antígeno peptídico reconocido por la célula T específica de antígeno; y
(e) una molécula de MHC de clase II multimérica que comprende un antígeno peptídico reconocido por la célula T específica de antígeno,

20 en donde la nanopartícula tiene un diámetro medio de partícula de 25 nm a 125 nm.

2. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde el resto es el anticuerpo específico anti-TCR anti-clonotípico.

3. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde el resto es un dímero de MHC-Ig.

25 4. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde el resto es la molécula de MHC de clase I monomérica.

5. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde el resto es la molécula de MHC de clase I multimérica.

30 6. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde el resto es la molécula de MHC de clase II monomérica.

7. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde el resto es la molécula de MHC de clase II multimérica.

35 8. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el antígeno de la célula diana es un antígeno tumoral, un antígeno de un patógeno o un autoantígeno.

9. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la nanopartícula tiene un diámetro medio de partícula de 50 a 100 nm.

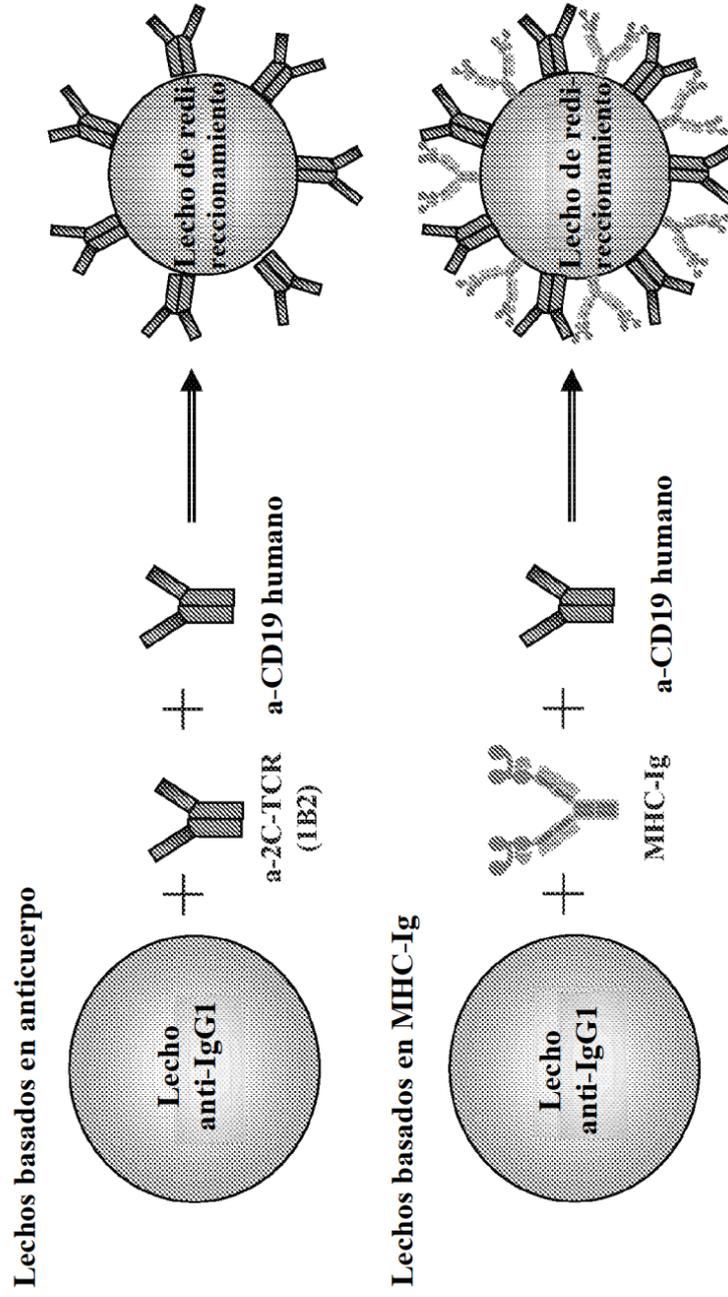
40 10. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 9, en donde la célula diana es una malignidad hematológica.

45 11. La nanopartícula de la reivindicación 10, en donde el anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de la célula diana o epítipo del mismo es un anticuerpo anti-CD19, y en donde el resto que se une a una célula T específica de antígeno es un dímero de MHC-Ig.

12. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además en su superficie una molécula coestimuladora de células T.

50 13. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el direccionamiento selectivo de células T específicas de antígeno a células diana en un paciente, en donde las células diana se seleccionan de células tumorales, células infectadas con un patógeno y células implicadas en trastornos autoinmunes.

FIG. 1A



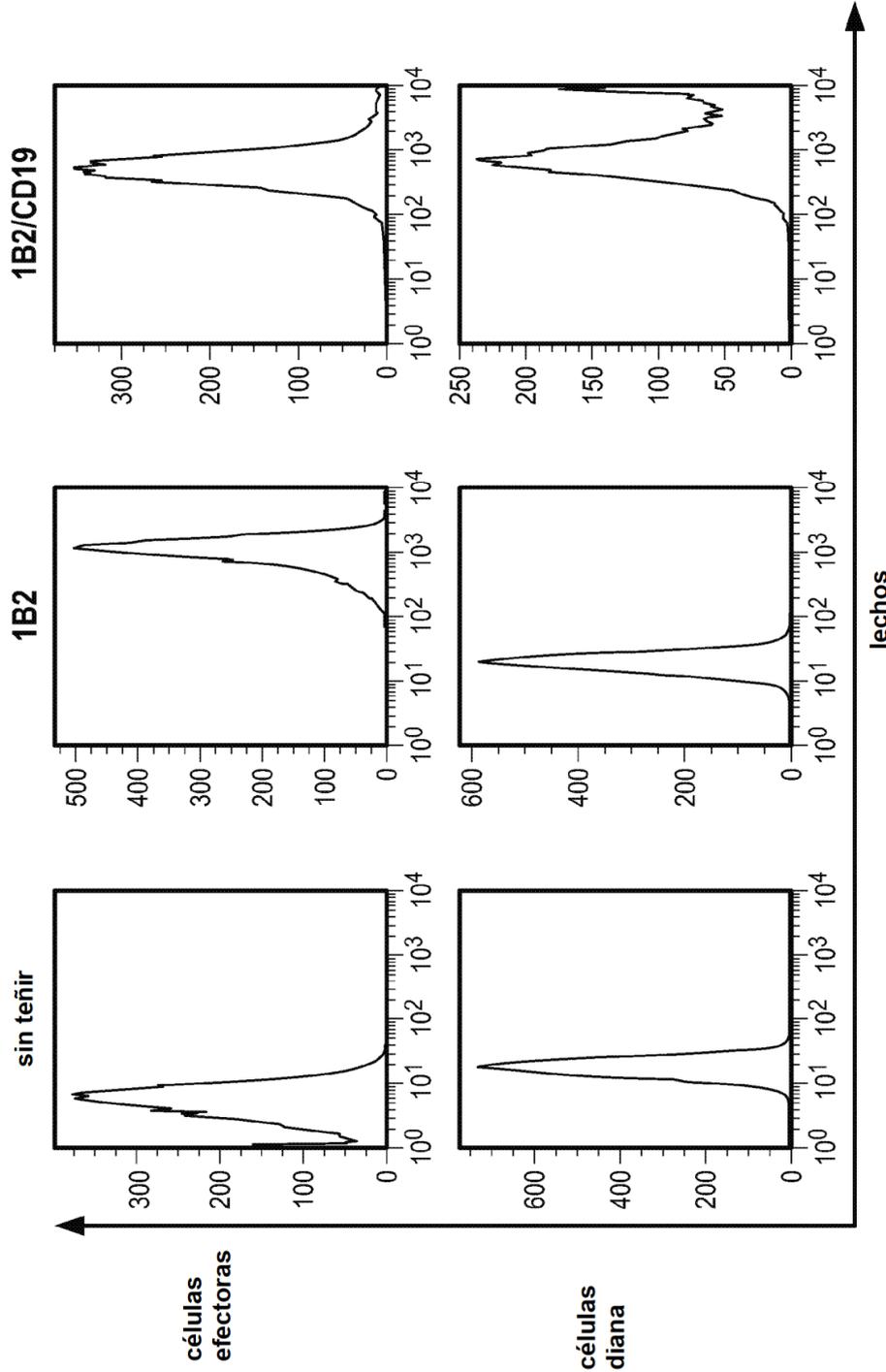


FIG. 1B

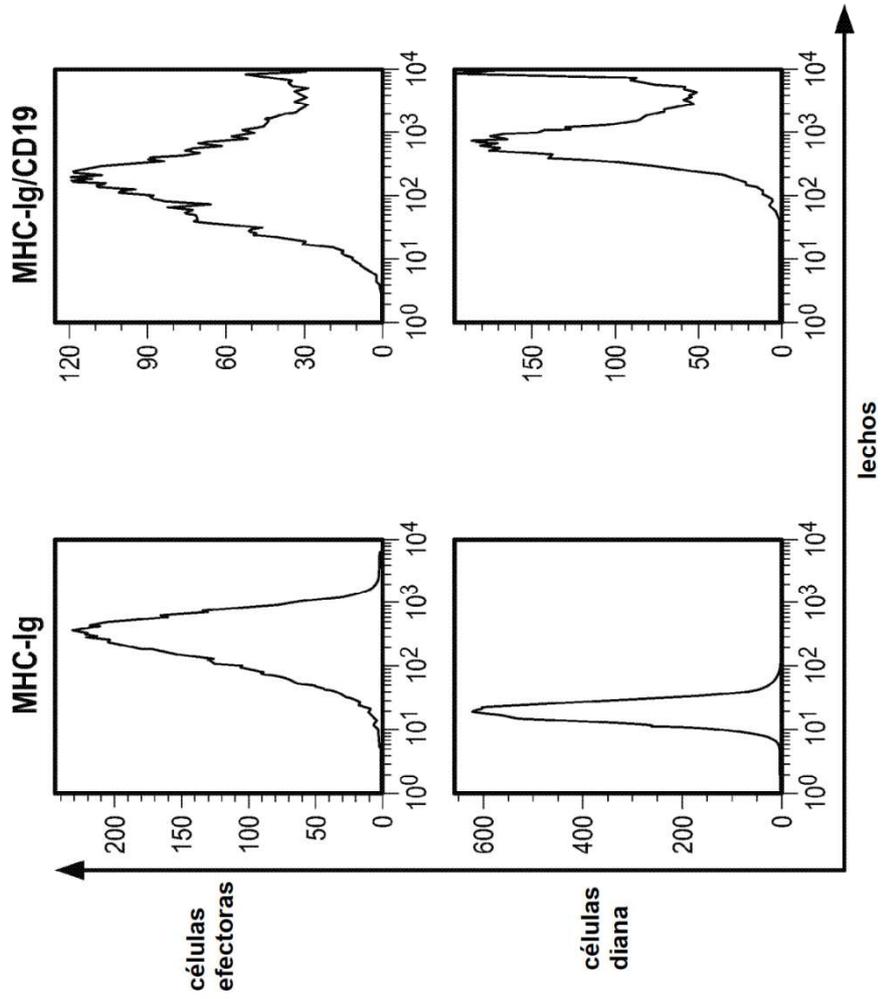
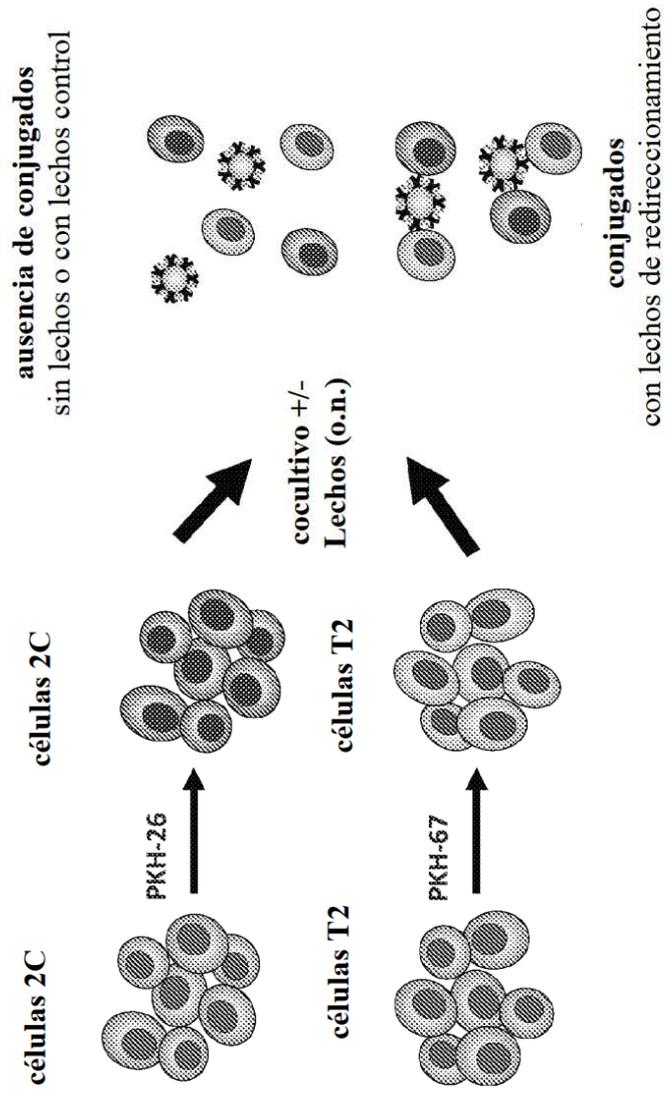


FIG. 1B (Cont.)

FIGURA 2A



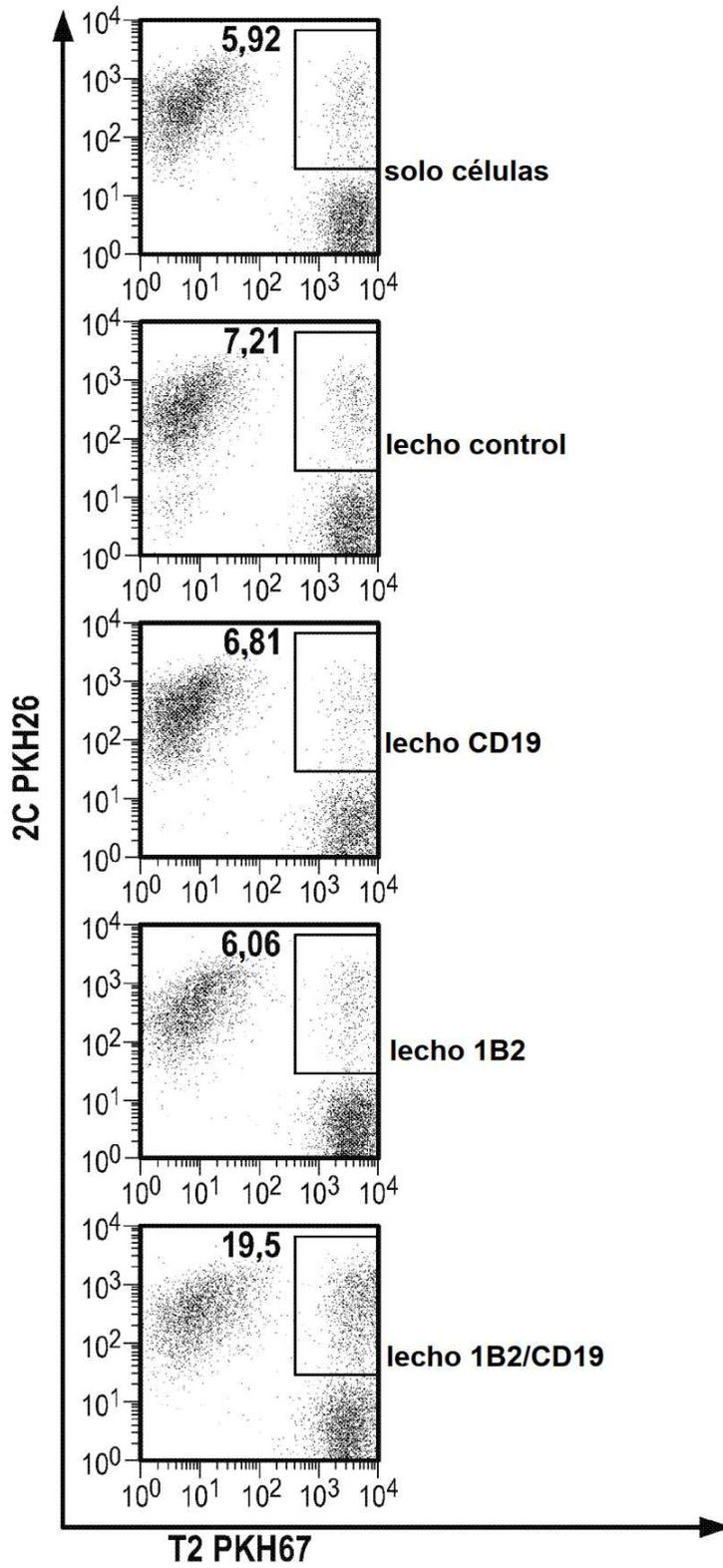


FIG. 2B

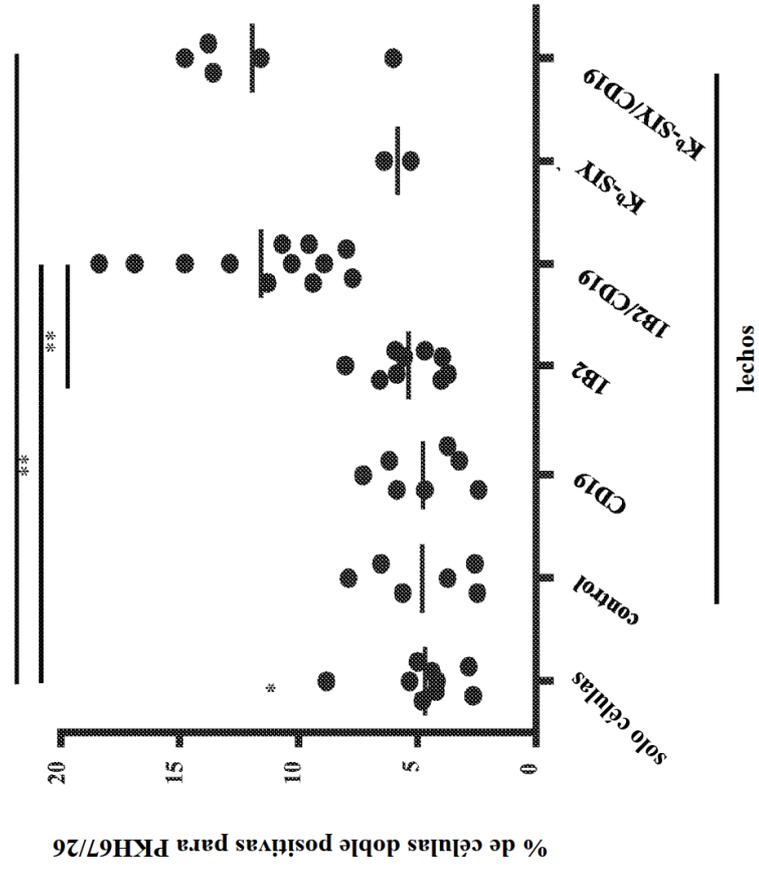


FIGURA 2C

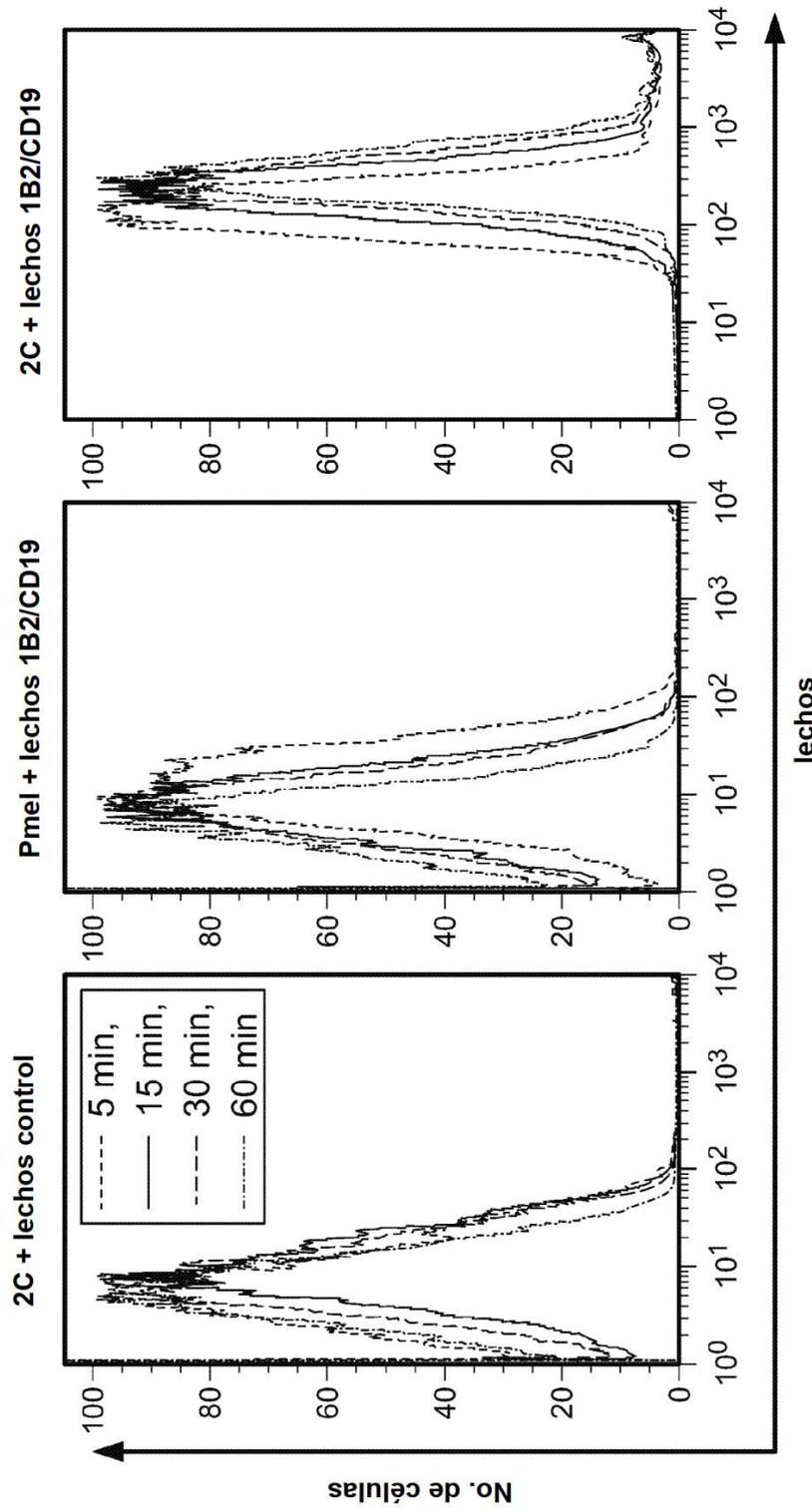


FIG. 3A

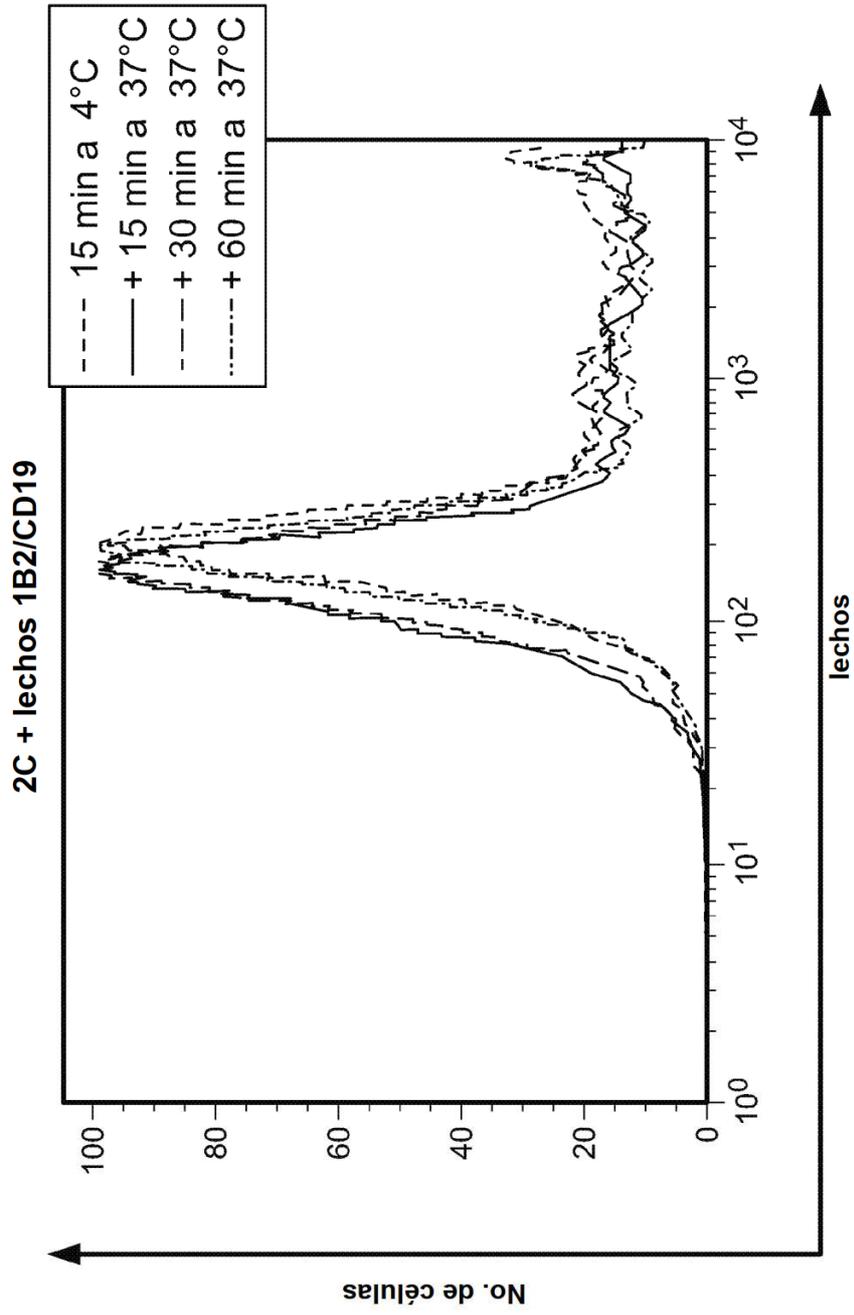


FIG. 3B

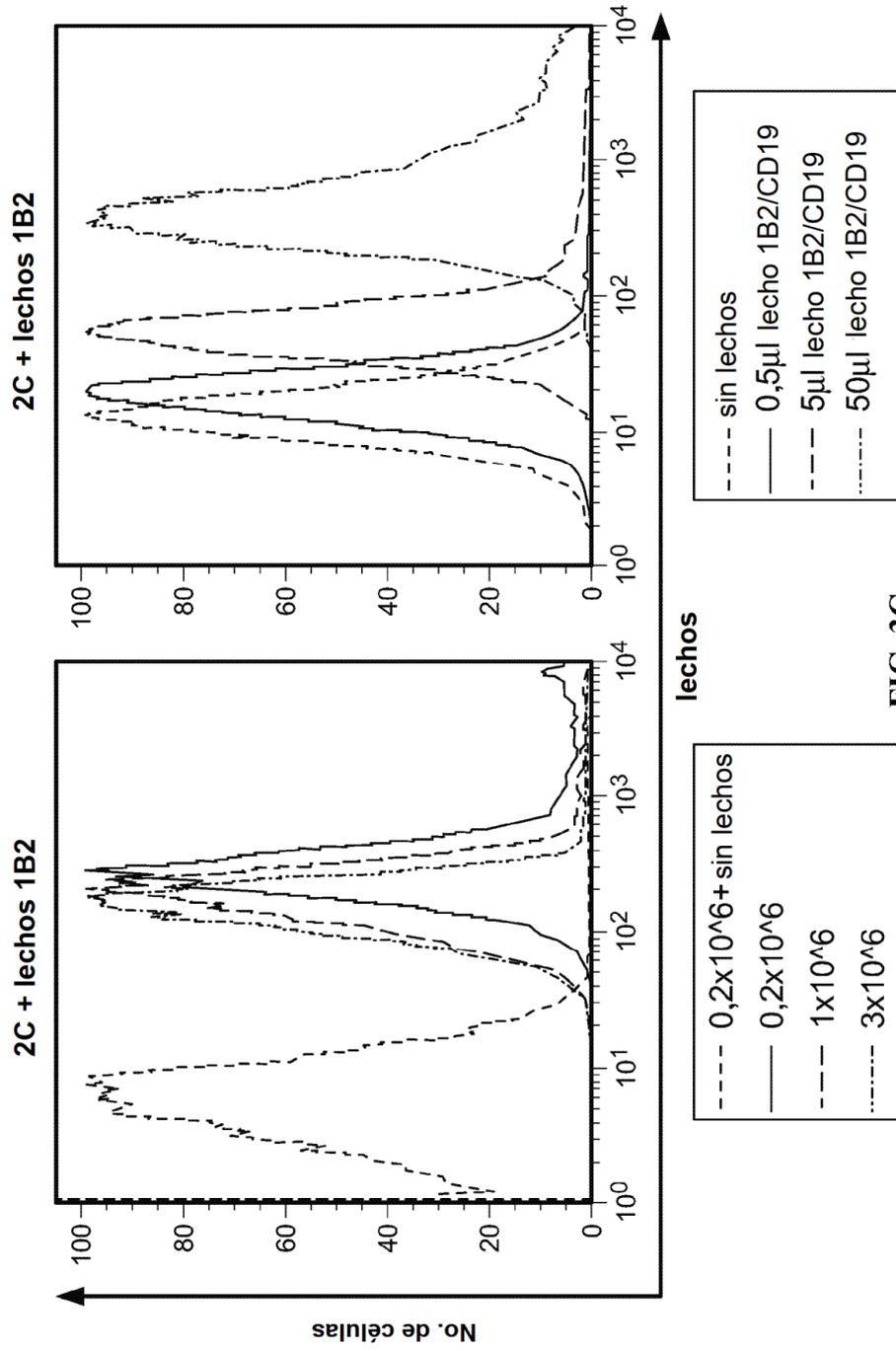


FIG. 3C

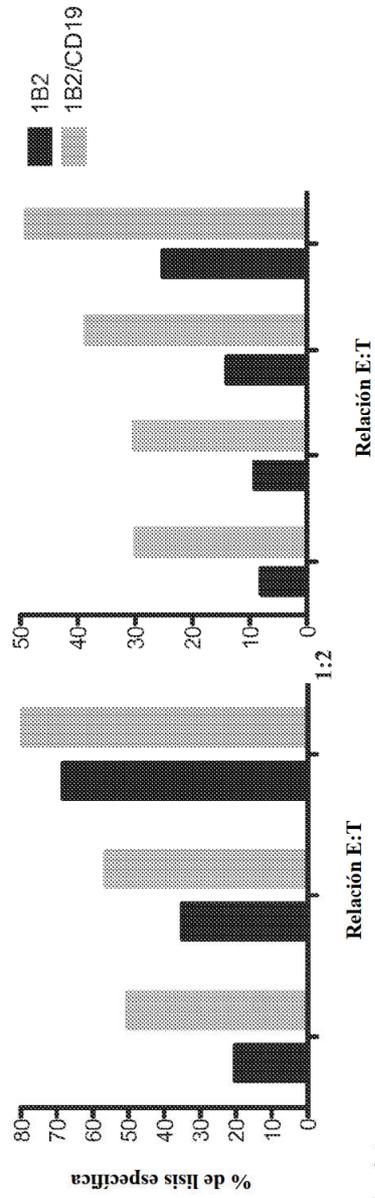


FIG. 4A

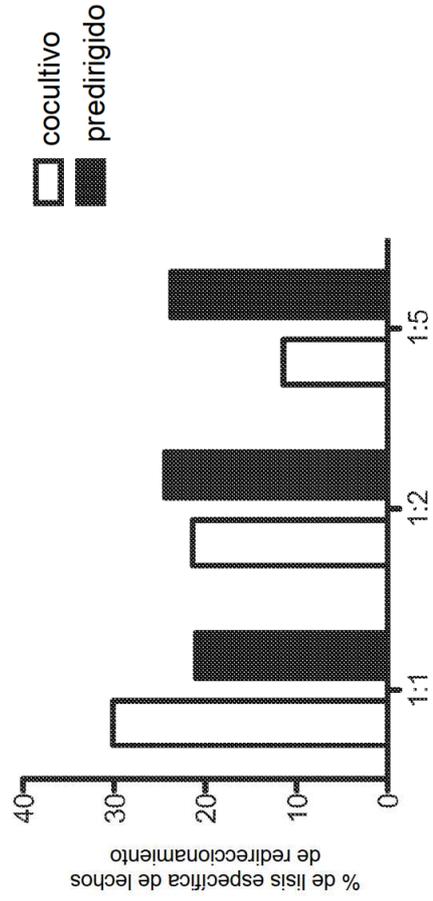


FIG. 4B

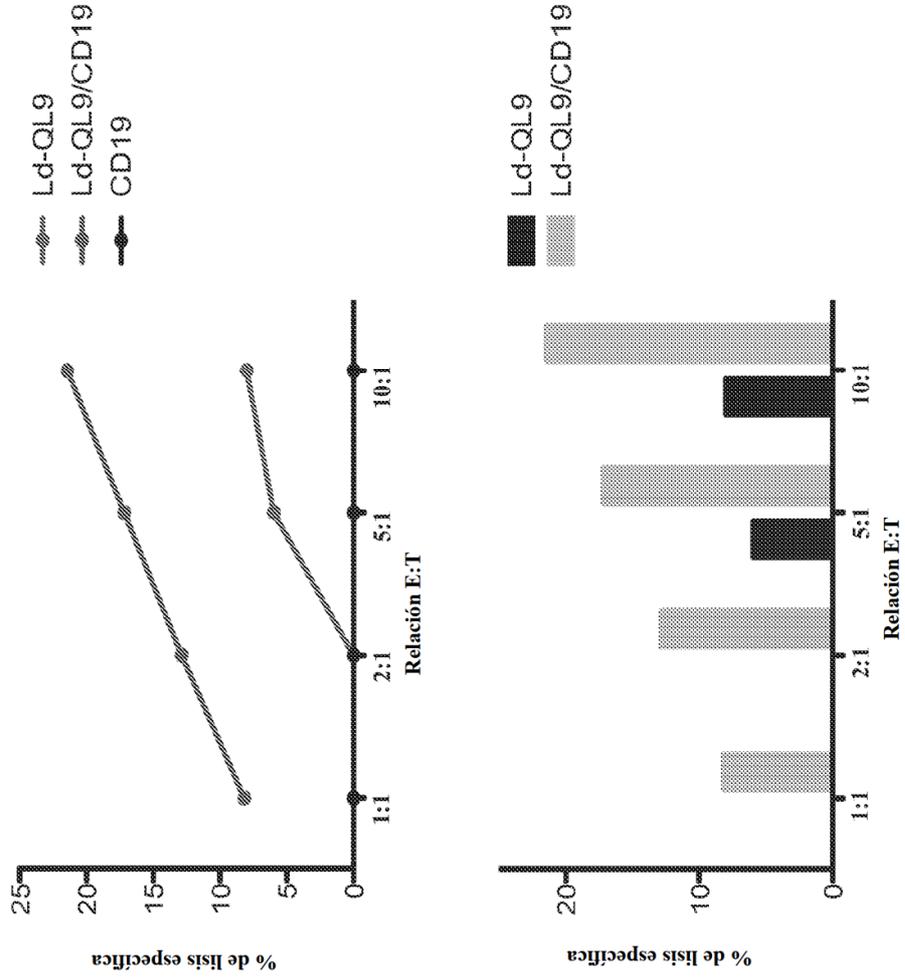


FIG. 5A

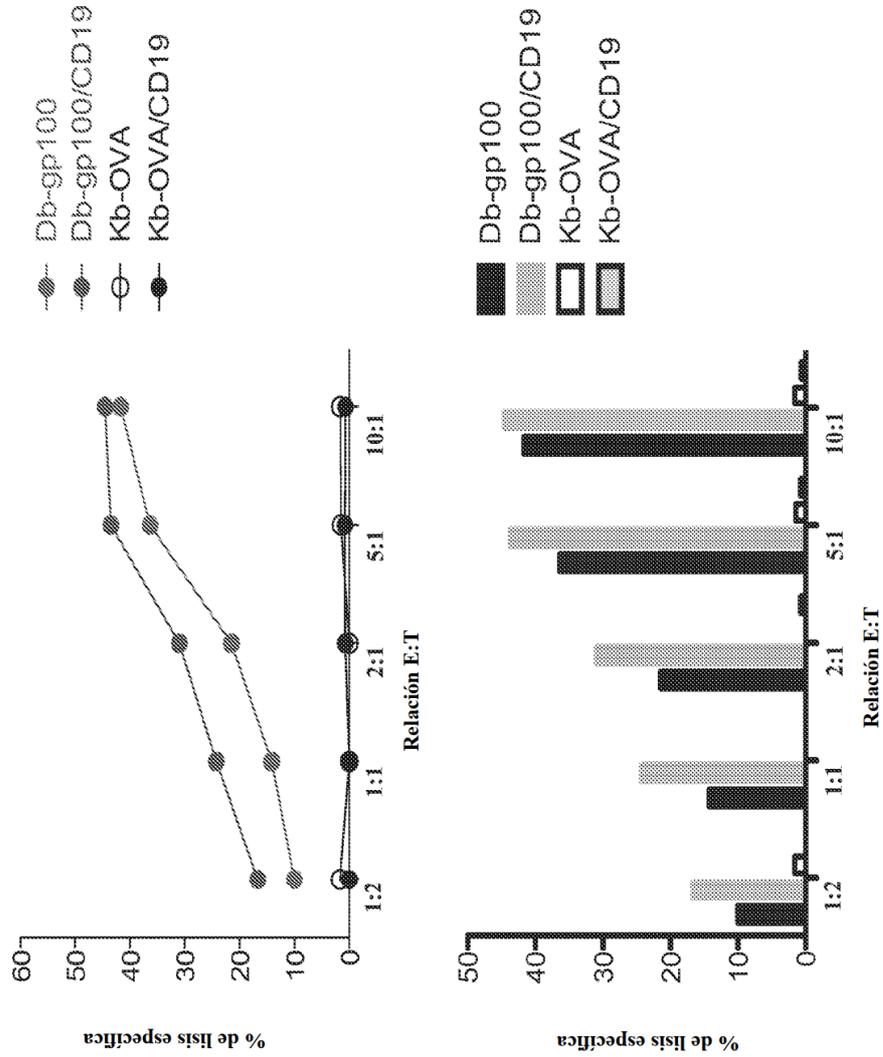


FIG. 5B