

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 541**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2010** **E 10777061 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016** **EP 2483294**

54 Título: **Receptor de linfocitos T**

30 Prioridad:

29.09.2009 GB 0917090

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

28.09.2016

73 Titular/es:

**UCL BUSINESS PLC (100.0%)
The Network Building 97 Tottenham Court Road
London W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:

**STAUSS, HANS;
XUE, SHAO-AN y
TOPP, MAX**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

Observaciones :

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

ES 2 584 541 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

Receptor de linfocitos T.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un receptor de linfocitos T (TCR) capaz de reconocer un antígeno del virus de Epstein Barr (EBV). La presente invención también se refiere al uso de la transferencia de genes de TCR para producir linfocitos T específicos de EBV y su uso para tratar y/o prevenir una enfermedad asociada a EBV.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El virus Epstein-Barr (EBV), un miembro de la familia de los herpesvirus, se encuentra en todo el mundo. Los estudios muestran que hasta el 95 % de todos los adultos tienen anticuerpos contra este virus común, lo que significa que han estado infectados en algún momento de su vida. El EBV generalmente persiste durante toda la vida en la mayoría de las personas que están infectadas y rara vez causa problemas. Sin embargo, en algunos casos, EBV se ha vinculado al desarrollo de cánceres y afecciones serias, incluyendo linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo y trastorno linfoproliferativo postrasplante, un tipo de linfoma de linfocitos B que puede aparecer en pacientes tras un trasplante de órganos sólidos o de células madre hematopoyéticas (HSCT).

20

Por lo tanto, existe la necesidad de métodos para tratar y/o prevenir enfermedades asociadas a EBV.

ORENTAS RIMAS J Y COL: CLINICAL IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, ESTADOS UNIDOS, vol 98, n.º 2, 1 de febrero de 2001 (01-02-2001), páginas 220-228 se refiere a la transducción retroviral de un receptor de linfocitos T específico para un péptido codificado por el virus Epstein-Barr.

25

HART D P Y COL: GENE THERAPY, vol 15, n.º 8, abril de 2008 (04-2008), páginas 625-631 desvelan que la transferencia retroviral de un TCR dominante impide la expresión superficial de un gran proporción del repertorio de TCR endógeno en linfocitos T humanos.

30

LEE S P Y COL: "HLA A2.1-RESTRICTED CYTOTOXIC T CELLS RECOGNIZING A RANGE OF EPSTEIN-BARR VIRUS ISOLATES THROUGH A DEFINED EPITOPE IN LATENT MEMBRANE PROTEIN LMP2", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US, vol 67, n.º 12, 1 de diciembre de 1993 (01-12-1993), páginas 7428-7435 indica linfocitos T citotóxicos restringidos para HLA A2.1 que reconocen una gama de aislados del virus Epstein Barr a través de un epítipo definidos en una proteína latente de membrana LMP2.

35

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1 - Esquema de la construcción del vector retroviral pMP71-pp65(alfa-2A-beta)-Cysl.
Figura 2 - Transducción EBV-sVβ-TCR de huPBMC
Figura 3 - EBV-sVβ-TCR-X3-CD4-cytK
Figura 4 - EBV-sVβ-TCR-X3-CD8-cytK

40

SUMARIO DE ASPECTOS DE LA INVENCION

45

Los presentes inventores han desarrollado una terapia celular para tratar y/o prevenir enfermedades asociadas a EBV que implica usar terapia génica de TCR para producir linfocitos T específicos de EBV.

Los presentes inventores han construido un receptor de linfocitos T que es específico para la proteína LMP-2 de EBV. También se ha construido un vector retroviral que comprende los genes de TCR α y β , y se ha usado para transducir linfocitos T humanos. Se demostró que las células expresan TCR específico de LMP-2 y muestran una actividad específica del antígeno funcional.

50

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un receptor de linfocitos T (TCR) que se une a un péptido de la proteína latente de membrana 2 (LMP-2) del virus Epstein Barr (EBV) que tiene la secuencia aminoacídica CLBLLTMV (SEQ ID No. 1) cuando se presenta por una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), en el que cada una de la cadena α y la cadena β comprende tres regiones determinantes de complementariedad

55

(CDR) y la secuencia de cada CDR3 es como se indica a continuación:

CDR3 α - FCAMREGSGSARQLTFGSGTQLTVLPD (SEQ ID No. 2)

CDR3 β - ASSLGPAIQETQYFGPGTRLLVL (SEQ ID No. 3)

5

o una variante de aquellas secuencias que tienen hasta tres cambios de aminoácidos.

Las CDR de la cadena α pueden tener las siguientes secuencias de aminoácidos:

10

CDR1 α - TSDQSYG (SEQ ID No. 4)

CDR2 α - QGSYDEQ (SEQ ID No. 5)

CDR3 α - FCAMREGSGSARQLTFGSGTQLTVLPD (SEQ ID No. 2)

o variantes de aquellas secuencias que tienen hasta tres cambios de aminoácidos.

15

Las CDR de la cadena β pueden tener las siguientes secuencias de aminoácidos:

CDR1 β - SSHAT (SEQ ID No. 6)

CDR2 β - FNYEAQ (SEQ ID No. 7)

20

CDR3 β - ASSLGPAIQETQYFGPGTRLLVL (SEQ ID No. 3).

o variantes de aquellas secuencias que tienen hasta tres cambios de aminoácidos.

El TCR del primer aspecto de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID No. 8 o una variante de la misma que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos.

El TCR del primer aspecto de la invención puede comprender una o más mutaciones en la interfaz de la cadena α /cadena β de TCR, de tal forma que cuando la cadena α y la cadena β de TCR como se define en cualquier reivindicación anterior, se expresan en un linfocito T, la frecuencia de los emparejamientos incorrectos entre estas cadenas y la cadena α y la cadena β de TCR se reduce.

Por ejemplo, en el TCR del primer aspecto de la divulgación, los dominios de la región constante de la cadena α y la cadena β pueden comprender cada uno un residuo de cisteína adicional, lo que permite la formación de un enlace disulfuro adicional entre la cadena α y la cadena β .

El segundo aspecto proporciona secuencia de nucleótidos que codifican todo o una parte del TCR de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

Una primera realización del segundo aspecto de la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena α de un TCR de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

La secuencia de nucleótidos de esta primera realización puede comprender las bases 1-810 de la secuencia de nucleótidos mostrada como la SEQ ID No. 9 o una variante de la misma que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia.

Una segunda realización del segundo aspecto de la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena β de un TCR de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

La secuencia de nucleótidos de esta segunda realización puede comprender las bases 886-1812 de la SEQ ID No. 9 o una variante de la misma que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia.

Una tercera realización del segundo aspecto de la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena α de TCR unida a una cadena β de TCR.

55

La secuencia de nucleótidos puede comprender los genes α y β de TCR unidos por una secuencia de auto-escisión interna.

La secuencia de nucleótidos de esta tercera realización puede comprender la secuencia mostrada como la SEQ ID No. 9 o una variante de la misma que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención. El vector puede ser, por ejemplo, un vector retroviral.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una célula que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención. La célula puede ser, por ejemplo, un linfocito T o una célula madre. La célula puede obtenerse a partir de un linfocito T aislado de un sujeto.

10

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención que comprende la etapa de transducir o transfectar una célula *in vitro* o *ex vivo* con un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención.

15 Se describe un método para tratar y/o prevenir una enfermedad asociada a EBV en un sujeto que comprende la etapa de una transferencia adoptiva de un linfocito T específico de EBV al sujeto, en el que el linfocito T específico de EBV está hecho por transferencia génica de TCR.

El linfocito T comprende una o más secuencias de nucleótidos heterólogas capaces de codificar un TCR específico de EBV.

El TCR puede ser según el primer aspecto de la invención.

El método puede usarse para tratar o prevenir una enfermedad asociada a EBV tal como linfoma de Hodgkin positivo a EBV, carcinoma nasofaríngeo positivo a EBV o trastorno linfoproliferativo postrasplante positivo a EBV (PTLD).

Se describe un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención o una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad asociada a EBV en un sujeto.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención o una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención.

35 También se describe el uso de un TCR de acuerdo con el primer aspecto de la invención, una secuencia de nucleótidos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, o una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad asociada a EBV en un sujeto.

40 DESCRIPCIÓN DETALLADA

RECEPTOR DE LINFOCITOS T

45 Durante el procesamiento del antígeno, los antígenos se degradan dentro de las células y después se transportan a la superficie celular mediante moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Los linfocitos T son capaces de reconocer este complejo peptídico en la superficie de la célula que presenta antígenos. Existen dos clases diferentes de moléculas del MHC: MHC I y MHC II, que transportan péptidos desde diferentes compartimentos celulares hacia la superficie celular.

50 El receptor de linfocitos T o TCR es la molécula hallada en la superficie de los linfocitos T que es responsable de reconocer los antígenos unidos a las moléculas del MHC. El heterodímero del TCR consiste en una cadena alfa y beta en un 95 % de los linfocitos T, mientras un 5 % de los linfocitos T tienen TCR que consisten en cadenas gamma y delta.

55 El acoplamiento del TCR con el antígeno y el MHC da como resultado la activación de su linfocito T a través de una serie de sucesos bioquímicos mediados por enzimas asociadas, co-receptores, y moléculas secundarias especializadas.

Cada cadena del TCR es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas y posee un dominio variable (V) de

inmunoglobulina (Ig) N-terminal, un dominio constante (C) de Ig, una región que atraviesa la membrana celular/transmembrana, y una cola citoplasmática corta en el extremo C-terminal.

El dominio variable tanto de la cadena α como de la cadena β de TCR tiene tres regiones hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). La CDR3 es la CDR principal responsable de reconocer el antígeno procesado, aunque también se ha demostrado que la CDR1 de la cadena alfa interacciona con la parte N-terminal del péptido antigénico, mientras que la CDR1 de la cadena beta interacciona con la parte C-terminal del péptido. Se cree que la CDR2 reconoce la molécula del MHC.

10 El dominio constante del dominio de TCR consiste en secuencias cortas de conexión en las que un residuo de cisteína forma un enlace disulfuro, produciendo una unión entre las dos cadenas. El TCR de la presente invención puede tener un residuo de cisteína adicional en cada una de las cadenas α y β , de forma que el TCR comprende dos enlaces disulfuro en los dominios constantes (véase más adelante).

15 La estructura permite que el TCR se asocie con otras moléculas como CD3 que poseen tres cadenas diferentes (γ , δ y ϵ) en mamíferos y la cadena ζ . Estas moléculas secundarias tienen regiones transmembrana cargadas negativamente y son vitales para propagar la señal del TCR en la célula. Las cadenas de CD3 y ζ , junto con el TCR, forman lo que se conoce como el complejo receptor de linfocitos T.

20 La señal del complejo de linfocitos T se mejora mediante la unión simultánea de las moléculas del MHC mediante un co-receptor específico. En los linfocitos T auxiliares, este co-receptor es CD4 (específico del MHC de clase II); mientras que en los linfocitos T citotóxicos, este co-receptor es CD8 (específico del MHC de clase I). El co-receptor no solamente asegura la especificidad del TCR para un antígeno, sino que también permite un acoplamiento prolongado entre la célula que presenta antígenos y el linfocito T, y recluta moléculas esenciales (por ejemplo, LCK) dentro de la célula implicada en la señalización del linfocito T activado.

25 Por lo tanto, la expresión "receptor de linfocitos T" se usa en el sentido convencional para referirse a una molécula capaz de reconocer un péptido cuando se presenta por una molécula del MHC. La molécula puede ser un heterodímero de dos cadenas α y β (u opcionalmente γ y δ), o puede ser una construcción de TCR de cadena sencilla.

La presente invención también proporciona la cadena α o la cadena β de tal receptor de linfocitos T.

35 El TCR de la presente invención puede ser un TCR híbrido que comprende secuencias obtenidas a partir de más de una especie. Por ejemplo, se ha descubierto sorprendentemente que los TCR murinos se expresan de manera más eficaz en los linfocitos T humanos que los TCR humanos. Por lo tanto, el TCR puede comprender regiones variables humanas y regiones constantes murinas. Una desventaja de este enfoque es que las secuencias constantes murinas pueden desencadenar una respuesta inmunitaria, que conduce al rechazo de los linfocitos T transferidos.

40 Sin embargo, los regímenes de acondicionamiento usados para preparar a los pacientes para la terapia adoptiva de linfocitos T pueden dar como resultado una inmunodepresión suficiente para permitir el injerto de linfocitos T que expresan las secuencias murinas.

SECUENCIAS DE CDR

45 El TCR del primer aspecto de la invención comprende dos cadenas (α y β), cada una de las cuales comprende tres regiones determinantes de complementariedad.

La diversidad de los receptores de linfocitos T se centra en la CDR3 y esta región es principalmente responsable del reconocimiento de antígenos. Las secuencias de las regiones CDR3 del TCR de la presente invención son:

CDR3 α - FCAMREGSGSARQLTFGSGTQLTVLPD (SEQ ID No. 2)
CDR3 β - ASSLGPAIQETQYFGPGTRLLVL (SEQ ID No. 3)

55 o una variante de aquellas secuencias que tienen hasta tres cambios de aminoácidos.

La cadena α puede comprender CDR que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

CDR1 α - TSDQSYG (SEQ ID No. 4)
 CDR2 α - QGSYDEQ (SEQ ID No. 5)
 CDR3 α - FCAMREGSGSARQLTFGSGTQLTVLPD (SEQ ID No. 2).

5 La cadena β puede comprender CDR que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

CDR1 β - SSHAT (SEQ ID No. 6)
 CDR2 β - FNYEAQ (SEQ ID No. 7)
 CDR3 β - ASSLGPAQIETQYFGPGTRLLVL (SEQ ID No. 3).

10

Las CDR pueden comprender uno o más "cambios", tales como sustituciones, adiciones o deleciones de la secuencia determinada, con la condición de que el TCR conserve la capacidad de unirse al epítipo pp65:complejo de MHC. El cambio puede implicar la sustitución de un aminoácido por un aminoácido similar (una sustitución conservativa). Un aminoácido similar es uno que tiene un resto de cadena lateral con propiedades relacionadas que se agrupan jutas, por ejemplo, como se muestra a continuación:

15

- (i) cadenas laterales básicas: lisina, arginina, histidina
- (ii) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico
- (iii) cadenas laterales polares no cargadas: asparagina, glutamina, serina, treonina y tirosina
- (iv) cadenas laterales no polares: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano y cisteína.

20

Cualquier cambio de aminoácido debe mantener o mejorar la capacidad de unirse a moléculas del MHC. Por ejemplo, si el péptido es capaz de unirse a moléculas del MHC del alelo HLA-A*0201, entonces se prefiere que los aminoácidos en la posición 2 del péptido (es decir, el segundo aminoácido desde el extremo N) sean leucina o metionina, aunque también se toleran isoleucina, valina, alanina y treonina. También se prefiere que el aminoácido en la posición 9 o 10 sea valina, leucina o isoleucina, aunque también se toleran alanina, metionina y treonina. Los motivos de unión de MHC preferidos u otros alelos HLA se desvelan en Celis y col., Molecular Immunology, Vol. 31, 8, diciembre de 1994, páginas 1423 a 1430.

30

El TCR del primer aspecto de la invención puede comprender la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 8) o una variante de la misma que tiene al menos un 80 %, 90 % o un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos:

EBVa14-p2A-Vb7.7-aa:

MSLSLLKVV	TASLWLGPGI	AQKITQTQPG	MFVQEKEAVT	LDCTYDTSQ
SYGLFWYKQP	SSGEMIFLIY	QGSYDEQNAT	EGRYSLNFQK	ARKSANLVIS
ASQLGDSAMY	FCAMREGSGS	ARQLTFGSGT	QLTVLPDIQN	PEPAVYQLKD
PRSQDSTLCL	FTDFDSQINV	PKTMESGTFI	TDKCVLDMKA	MDSKSNAGIA
WSNQTSTFCQ	DIFKETNATY	PSSDVPCDAT	LTEKSFETDM	NLNFQNLVSM
GLRILLKVA	GFNLLMTLRL	WSSGSGATNF	SLLKQAGDVE	ENPGPMGTSL
LCWVVLGFLG	TDHTGAGVSQ	SPRYKVTKRQ	QDVTLCRCDPI	SSHATLYWYQ
QALGQGPEFL	TYFNYEAQPD	KSGLPSTRFS	AERPEGSIST	LTIQRTEQRD
SAMYRCASSL	GPAGIQETOY	FGPGTRLLVL	EDLRNVTTPK	VSLFEPKAE
IANKQKATLV	CLARGFFPDH	VELSWVWNGK	EVHSGVCTDP	QAYKESNYSY
CLSSRLRVSA	TFWHNPRNHF	RCQVQFHGLS	EEDKWPEGSP	KPVTQNISAE
AWGRADCGIT	SASYHQGVLS	ATILYEILLG	KATLYAVLVS	GLVLMAMVKK
KNS•				

35

Azul: Secuencias constantes.

Rojo: Moléculas de cisteína para el enlace disulfuro intercatenario.

Rosa: Secuencias 2A.

Negro: Secuencias variables

40

Regiones CDR1, 2 y 3 subrayadas.

Las secuencias de variantes pueden comprender adiciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos. La variación se puede concentrar en una o más regiones, tales como las regiones constantes, el enlazador, o las regiones estructurales de las cadenas α o β , o se pueden extender a lo largo de la molécula.

45

Las comparaciones de identidad se pueden realizar manualmente, o, más normalmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles en el mercado pueden calcular el % de identidad entre dos o más secuencias.

El % de identidad se puede calcular en secuencias contiguas, es decir, se alinea una secuencia con la otra secuencia y cada aminoácido de una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente de la otra secuencia, residuo a residuo. Esto se denomina alineación "sin huecos". En general, tales alineaciones sin huecos se realizan solamente en un número relativamente corto de residuos.

5

Aunque es un método muy sencillo y coherente, no tiene en cuenta, por ejemplo, que en un par de secuencias, por otra parte idénticas, una inserción o delección provocará que los residuos de aminoácidos posteriores queden desalineados, lo que potencialmente dará como resultado una gran reducción del % de homología al realizar una alineación global. En consecuencia, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineaciones óptimas que tienen en cuenta las posibles inserciones y delecciones sin penalizar excesivamente el índice de homología total. Esto se consigue insertando "huecos" en la alineación de secuencias para intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones por huecos" a cada hueco que se da en la alineación de forma que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de secuencias con los mínimos huecos posibles - lo que refleja una mayor relación entre las dos secuencias comparadas - conseguirá un índice mayor que una con muchos huecos. En general, se usan "costes por huecos afines" que cargan un coste relativamente elevado por la existencia de un hueco y una penalización menor por cada residuo posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos usado con más frecuencia. Por supuesto, las penalizaciones elevadas por huecos producirán alineaciones optimizadas con menos huecos. La mayoría de los programas de alineación permiten modificar las penalizaciones por los huecos. Sin embargo, se prefiere usar los valores por defecto cuando se usan estos programas para las comparaciones de secuencias. Por ejemplo, cuando se usa el paquete GCG Wisconsin Bestfit, la penalización por huecos por defecto para las secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

25

El cálculo de la identidad máxima en %, por lo tanto, requiere en primer lugar la producción de una alineación óptima, teniendo en cuenta las penalizaciones por huecos. Un programa informático adecuado para realizar tal alineación es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, Estados Unidos; Devereux y col., 1984, Nucleic Acids Research 12: 387). Los ejemplos de otros programas que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete BLAST (véase Ausubel y col., 1999 *Ibíd.* - Capítulo 18), FASTA (Atschul y col., 1990, J. Mol. Biol., 403-410) y la serie GENWORKS de herramientas de comparación. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para búsquedas fuera de línea y en línea (véase Ausubel y col., 1999 *Ibíd.*, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere usar el programa GCG Bestfit. BLAST 2 Sequences también está disponible para comparar secuencias de proteínas y nucleótidos (véase FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

35

Las secuencias también pueden tener delecciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso, y dan como resultado una sustancia funcionalmente equivalente. Se pueden hacer sustituciones de aminoácidos deliberadas basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos, siempre que se conserve la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina, y tirosina.

45

Se pueden hacer sustituciones conservativas, por ejemplo, de acuerdo con la Tabla siguiente. Se pueden sustituir entre sí los aminoácidos del mismo bloque de la segunda columna, y preferiblemente de la misma línea de la tercera columna.

ALIFÁTICOS	No polares	G A P
		I L V
	Polares - no cargados	C S T M
		N Q
	Polares - cargados	D E
		K R
AROMÁTICOS		H F W Y

50

La presente invención también incluye la sustitución homóloga (sustitución y reemplazo se usan ambos en el presente documento para referirse al intercambio de un residuo de aminoácido existente con un residuo alternativo),

es decir, la sustitución entre residuos parecidos, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También se puede dar la sustitución no homóloga, es decir, de una clase de residuo a otra o, de cómo alternativa, que implica la inclusión de aminoácidos no naturales, tales como ornitina (denominada en lo sucesivo en el presente documento como Z), ácido diaminobutírico-ornitina (denominado en lo sucesivo en el presente documento como B), norleucina-ornitina (en lo sucesivo en el presente documento como O), piriilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

LMP-2

- 10 El primer aspecto de la invención se refiere a un TCR que se une específicamente una proteína latente de membrana 2 (LMP-2) de EBV. LMP-2 se refiere a dos proteínas víricas asociadas al virus Epstein-Barr, LMP-2A y LMP-2B.

- LMP-2A/LMP-2B son proteínas transmembrana que actúan para bloquear la señalización de tirosina cinasa. Se cree
15 que actúan para inhibir la activación del ciclo lítico vírico.

LMP-2A tiene la secuencia dada a continuación:

```
1 mgslemvpmg agppspggdp dgddgggnnsq ypsasgssgn tptppndeer esneeppppy
61 edpywgnqdr hsdypqlgtq dgslylglqh dgndglpppp ysprddssqh iyeeagrgsm
121 npvcplpviva pylfwlaaia ascftasvst vvtatglals llllaavass yaaaqrkllt
181 pvtvltavvt ffaicltwri edppfnsllf allaaagglq giyvlvmlvl lilayrrrrwr
241 rltvcggimf lacvlvlivd avlqlspllg avtvvsmtil llaflvwlss pggglgtlgaa
301 lltlaaalal laslilgtln lttmflmlml wtlvvllics scsscplski llarlfllyal
361 allllasali aggsilqtnf kslsstefip nlfcmllliv agilfilail tewgsgnrt
421 gpvfmcldgg ltmvagavwl tvmtntllsa wiltagflif ligfalfgvi rceryccyy
481 ltleseerpp tpyrntv
```

- 20 LMP-2B tiene la secuencia dada a continuación:

```
1 mnpvcplpviv apylfwlaai aascftasvs tvvtatglal sllllaavas syaaaqrkll
61 tpvtvltavv tffaicltwr iedppfnsll fallaaaggl qgiyvlvmlv llilayrrrw
121 rrltvccgim flacvvlviv davlqlspll gavtvvsmtil lllaflvwlsl spggglgtlga
181 alltlaaalal llaslilgtl nlttmflmlml lwtlvvllic sscsscplsk illarlfllya
241 lallllasali iaggsilqtn fkslsstefi pnlfcmllli vagilfilai ltewgsgnrt
301 ygpvfmcldgg ltmvagavw tvmtntlls awiltagfli fligfalfgv irceryccyy
361 cltleseerp ptpyrntv
```

El péptido CLGGLTMV reconocido por el receptor de linfocitos T del primer aspecto de la invención se muestra en rojo en cada secuencia.

- 25 El TCR puede reconocer toda o parte de esta secuencia. El TCR puede reconocer una parte de esta secuencia junto con uno o más aminoácidos aguas arriba o aguas abajo (por ejemplo, hasta 5). El TCR puede reconocer toda o parte de la siguiente secuencia GPVFMCLGGLTMVAGAVW.

- 30 MOLÉCULAS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

El TCR se une al péptido en forma de un complejo péptido:MHC.

- La molécula del MHC puede ser una molécula de clase I o II del MHC. El complejo puede estar en la superficie de
35 una célula que presenta antígenos, tal como una célula dendrítica o un linfocito B, o se puede inmovilizar, por ejemplo, revistiéndolo sobre una microesfera o placa.

- El sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA) es el nombre del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en seres humanos, e incluye los antígenos de clase I del HLA (A, B y C) y los antígenos de clase II del HLA
40 (DP, DQ y DR).

REDUCCIÓN DE EMPAREJAMIENTOS INCORRECTOS

- El TCR del primer aspecto de la invención se puede expresar en un linfocito T para alterar su especificidad hacia el
45 antígeno. Los linfocitos T transducidos con el TCR expresan al menos dos cadenas alfa de TCR y dos cadenas beta de TCR. Aunque las cadenas alfa/beta del TCR endógeno forman un receptor que es auto-tolerante, las cadenas alfa/beta del TCR introducido forman un receptor con una especificidad definida hacia el antígeno diana concreto.

Sin embargo, se pueden dar emparejamientos incorrectos entre las cadenas endógenas y las introducidas para

formar receptores nuevos, que podrían exhibir especificidades inesperadas hacia auto-antígenos, y provocar un daño autoinmune al transferirlas a los pacientes.

5 Por lo tanto, se han explorado varias estrategias para reducir el riesgo de emparejamientos incorrectos entre las cadenas endógenas y las del TCR introducido. Las mutaciones de la interfaz alfa/beta de TCR es una estrategia empleada en la actualidad para reducir los emparejamientos incorrectos indeseados.

10 Por ejemplo, la introducción de una cisteína adicional en los dominios constantes de la cadena alfa y beta permite la formación de un enlace disulfuro adicional, y mejora el emparejamiento de las cadenas introducidas a la vez que reduce el emparejamiento incorrecto con las cadenas de tipo natural.

Por lo tanto, el TCR de la presente divulgación puede comprender una cisteína adicional en la cadena α y en la cadena β , que forman un enlace disulfuro adicional entre las dos cadenas, lo que produce dos enlaces disulfuro en total.

15 Las cisteínas adicionales se muestran en rojo en la secuencia de aminoácidos que se ha mostrado anteriormente en la Sección "Secuencias de CDR"

20 SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

El segundo aspecto de la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor TCR del primer aspecto de la invención tal como una o más CDR; la secuencia variable de la cadena α o la cadena β ; la cadena α y/o la cadena β .

25 La secuencia de nucleótidos puede ser bicatenaria o monocatenaria, y puede ser ARN o ADN.

Se pueden optimizar los codones de la secuencia de nucleótidos. Las diferentes células difieren en su uso de codones particulares. Esta tendencia de los codones corresponde a una tendencia en la abundancia relativa de los tARN particulares en el tipo celular. Mediante la alteración de los codones en la secuencia, de manera que se adapten para coincidir con la abundancia relativa de los tARN correspondientes, es posible aumentar la expresión.

30 Muchos virus, que incluyen el VIH y otros lentivirus, usan un gran número de codones poco frecuentes, y cambiando estos para que correspondan a los codones de mamífero usados habitualmente, se puede conseguir una expresión aumentada de los componentes de empaquetamiento en las células productoras mamíferas. Las tablas de uso de codones se conocen en la técnica para las células mamíferas, así como para una diversidad de otros organismos.

La optimización de codones también puede implicar la eliminación de motivos de inestabilidad del mRNA y de sitios crípticos de splicing.

40 La secuencia de nucleótidos del segundo aspecto de la invención puede comprender toda o parte de la siguiente secuencia (SEQ ID No. 9) o una variante de la misma que tiene al menos un 80 %, 90 % o un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos:

Sec. codificante de EBVa14-p2A-Vb7.7:

```

ATGTCACTTT CTAGCCTGCT GAAGGTGGTC ACAGCTTCAC TGTGGCTAGG
ACCTGGCATT GCCCAGAAGA TAACTCAAAC CCAACCAGGA ATGTTTCGTGC
AGGAAAAGGA GGCTGTGACT CTGGACTGCA CATATGACAC CAGTGATCAA
AGTTATGGTC TCTTCTGGTA CAAGCAGCCC AGCAGTGGGG AAATGATTTT
TCTTATTTAT CAGGGGTCTT ATGACGAGCA AAATGCAACA GAAGTTCGCT
ACTCATTGAA TTTCCAGAAG GCAAGAAAAT CCGCCAACCT TGTCTCTCC
GCTTCACAAC TGGGGGACTC AGCAATGTAT TTCTGTGCAA TGAGAGAGGG
TTCTGGTTCT GCAAGGCAAC TGACCTTTGG ATCTGGGACA CAATTGACTG
TTTTACCTGA TATCCAGAAC CCTGAGCCCG CGGTGTACCA GCTGAAGGAC
CCCAGAAGCC AGGACAGCAC CCTGTGCCTG TTCACCGACT TCGACAGCCA
GATCAACGTG CCCAAGACAA TGGAAAGCGG CACCTTCATC ACCGACAAGT
GCGTGCTGGA CATGAAGGCT ATGGACAGCA AGAGCAACGG CGCCATCGCC
TGGTCCAACC AGACCTCCTT CACATGCCAA GACATCTTCA AAGAGACCAA
CGCCACCTAC CCCAGCAGCG ACGTGCCCTG CGATGCCACT CTCACGAGA
AGAGCTTCGA GACCGACATG AACCTGAAC TCCAGAACCT GAGCGTGATG
GGCCTGAGAA TCCTGCTCCT GAAAGTGGCC GGCTTCAACC TGCTGATGAC
CCTGCGGCTC TGGAGTTCTG GCAGCGGCGC TACCAACTC AGCCTGCTGA
AGCAGGCCGG CGACGTGGAG GAAAACCTG GCCCCATGGG TACCAGTCTC
CTATGCTGGG TGGTCTGGG TTTCTAGGG ACAGATCACA CAGGTGCTGG
AGTCTCCAG TCTCCAGGT ACAAAGTCAC AAAGAGGGGA CAGGATGTAA
CTCTCAGGTG TGATCCAATT TCGAGTCATG CAACCCTTTA TTGGTATCAA
CAGGCCCTGG GGCAGGCCCG AGAGTTTCTG ACTTACTTCA ATTATGAAGC
TCAACCAGAC AAATCAGGGC TGCCAGTGA TCGGTTCTCT GCAGAGAGGC
CTGAGGGATC CATCTCCACT CTGACGATTC AGCGCACAGA GCAGCGGGAC
TCAGCCATGT ATCGCTGTGC TAGCAGCTTA GGTCCCGCAG GGATCCAAGA
GACCCAGTAC TTCGGGCCAG GCACGCGGCT CCTGGTGCTC GAGGACCTGC
GGAACGTGAC CCCCCCAAG GTGTCCCTGT TCGAGCCCAG CAAGGCCGAG
ATCGCCAACA AGCAGAAAGC CACACTGGTC TGTCTGGCTA GGGGCTTCTT
CCCCGACCAC GTGGAGCTGT CTTGGTGGGT CAACGGCAA GAAGTCCATA
GCGGCGTCTG CACCGACCCT CAGGCTTACA AAGAGAGCAA CTACTCTTAC
TGCTTGAGCA GCCGGCTGAG AGTGAGCGCC ACCTTCTGGC ACAACCCCCG
GAACCACTC CGGTGCCAGG TGCAATTCCA CGGCCTGAGC GAAGAGGACA
AGTGGCCTGA GGGCTCCCC AAGCCOGTGA CCCAGAACAT CAGCGCCGAG
GCCTGGGGCA GAGCCGACTG CGGCATCACC AGCGCCAGCT ACCACCAGGG
CGTGCTGTCC GCCACCATCC TGTACGAGAT CCTGCTGGGC AAGGCCACAC
TGTACGCCGT GCTGGTGTCC GGCCTGGTCC TGATGGCTAT GGTGAAGAAG
AAGAACAGCT GA

```

La secuencia de nucleótidos puede comprender la parte o partes de la secuencia anterior que codifican una o más CDR o una variante de la misma que tiene al menos un 80 %, 90 % o un 95 % de identidad de secuencia de 5 aminoácidos, estas partes son las siguientes secciones de la SEQ ID No. 9:

10 CDR1 α : 139-159
 CDR2 α : 211-231
 CDR3 α : 331-411
 CDR1 β : 1021-1035
 CDR2 β : 1087-1104
 CDR3 β : 1219-1290

15 La secuencia de nucleótidos puede comprende la parte o partes de la secuencia anterior que codifican una o más regiones variables o una variante de la misma que tiene al menos un 80 %, 90 % o un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, estas partes son:

20 V α : 1-411
 V β : 886-1290

La secuencia de nucleótidos puede comprende la parte o partes de la secuencia anterior que codifican la cadena α y/o la cadena β o una variante de la misma que tiene al menos un 80 %, 90 % o un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, estas partes son:

25 α - 1-810
 β - 886-1812.

30 Las secuencias de las variantes pueden tener adiciones, deleciones o sustituciones de una o más bases. Si la variación implica una adición o adiciones o una delección o deleciones, se pueden dar de tres en tres o estar equilibradas (es decir, una adición por cada delección), de manera que la variación no provoque un desplazamiento del marco de lectura para la traducción del resto de la secuencia.

Algunas o todas las variaciones pueden ser "silenciosas" en cuanto a que no afectan a la secuencia de la proteína codificada debido a la degeneración del código genético.

5 Algunas o todas las variaciones pueden producir sustituciones conservativas de aminoácidos, como se ha explicado anteriormente. La variación se puede concentrar en una o más regiones, tales como las regiones que codifican las regiones constantes, el enlazador, o las regiones estructurales de las cadenas α o β , o se pueden extender a lo largo de la molécula.

10 La secuencia de la variante debería conservar la capacidad de codificar todo o parte de una secuencia que se une a un complejo CLGGLTMV:MHC.

VECTOR

15 La presente invención también proporciona un vector que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

El término "vector" incluye un vector de expresión, es decir, una construcción capaz de expresarse *in vivo* o *in vitro/ex vivo*.

20 Los sistemas de administración víricos incluyen, pero sin limitación, un vector de adenovirus, un vector vírico adeno-asociado (AAV), un vector herpesviral, vector retroviral, vector lentiviral, vector baculoviral.

25 Los retrovirus son virus de ARN con un ciclo vital diferente al de los virus líticos. A este respecto, un retrovirus es una entidad infecciosa que se replica a través de un intermedio de ADN. Cuando un retrovirus infecta una célula, su genoma se convierte en una forma de ADN mediante una enzima transcriptasa inversa. La copia de ADN sirve como plantilla para la producción de los nuevos genomas de ARN y las proteínas codificadas por el virus necesarias para el ensamblaje de las partículas víricas infecciosas.

30 Existen muchos retrovirus, por ejemplo el virus de la leucemia murina (MLV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), virus del tumor mamario de ratón (MMTV), virus del sarcoma de Rous (RSV), virus del sarcoma de Fujinami (FuSV), virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MLV), virus del osteosarcoma murino FBR (FBR MSV), virus del sarcoma murino de Moloney (Mo-MSV), virus de la leucemia murina de Abelson (A-MLV), virus de la mielocitomatosis aviar 29 (MC29), y virus de la eritroblastosis aviar (AEV), y
35 todos los demás retroviridae, que incluyen los lentivirus.

Se puede hallar una lista detallada de retrovirus en Coffin y col. ("Retroviruses" 1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus págs. 758-763).

40 Los lentivirus también pertenecen a la familia de retrovirus, pero pueden infectar tanto células en división como células que no se dividen (Lewis y col (1992) EMBO J. 3053-3058).

45 El vector puede ser capaz de transferir un nucleótido de acuerdo con el segundo aspecto de la invención a una célula, tal como un linfocito T, de forma que la célula exprese un TCR específico de EBV. El vector debería ser capaz de expresarse idealmente a nivel elevado y de forma sostenida en los linfocitos T, de manera que el TCR introducido pueda competir con éxito con el TCR endógeno para una agrupación limitada de moléculas CD3.

50 El vector puede ser un vector retroviral. El vector se puede basar en u obtenerse a partir de la estructura del vector MP71. El vector puede carecer de una versión de longitud completa o truncada del elemento de respuesta de la hepatitis de marmota (WPRE).

Para una infección eficaz de las células humanas, las partículas víricas se pueden empaquetar con cubiertas anfótropas o cubiertas del virus de la leucemia de gibbon.

55 El aumento del suministro de moléculas CD3 puede aumentar la expresión de TCR en las células modificadas genéticamente. Por lo tanto, el vector también puede comprender los genes para CD3-gamma, CD3-delta, CD3-épsilon y/o CD3-zeta. El vector puede comprender solamente el gen para CD3-zeta. Los genes se pueden unir mediante secuencias autoescindibles, tales como la secuencia autoescindible 2A. Como alternativa, se pueden

proporcionar uno o más vectores diferentes que codifican el gen de CD3 para la co-transferencia con el vector o los vectores que codifican el TCR.

CÉLULA

5

El cuarto aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención. La célula puede expresar un receptor de linfocitos T del primer aspecto de la invención.

10 La célula puede ser un linfocito T. La célula puede obtenerse a partir de un linfocito T aislado de un sujeto. El linfocito T puede ser parte de una población de células mezcladas aisladas del sujeto, tal como una población de linfocitos de sangre periférica (PBL). Los linfocitos T dentro de la población de PBL se pueden activar mediante métodos conocidos en la técnica, tales como mediante el uso de anticuerpos anti-CD3 y CD28.

15 El linfocito T puede ser un linfocito T auxiliar CD4+ o un linfocito T citotóxico CD8+. La célula puede estar en una población mixta de linfocitos T auxiliares CD4+/linfocitos T citotóxicos CD8+. La activación policlonal, por ejemplo mediante el uso de anticuerpos anti-CD3 opcionalmente en combinación con anticuerpos anti-CD28, desencadenará la proliferación de los linfocitos T CD4+ y CD8+, pero puede desencadenar también la proliferación de linfocitos T reguladores CD4+25+. La transferencia de genes de TCR en los linfocitos T reguladores es indeseable, ya que

20 puede inhibir la actividad antiviral de los linfocitos T citotóxicos y auxiliares modificados genéticamente. Por lo tanto, la población CD4+CD25+ se puede reducir antes de la transferencia de genes de TCR.

La presente invención también proporciona un método de producción de una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención que comprende la etapa de transfectar o transducir una célula *in vitro* o *ex vivo* con un

25 vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención.

La célula se puede aislar del sujeto al que se va a transferir de manera adoptiva la célula genéticamente modificada. A este respecto, la célula se puede producir aislando un linfocito T de un sujeto, opcionalmente activando el linfocito T, con la transferencia de genes de TCR *ex vivo* y la inmunoterapia posterior del sujeto mediante la transferencia

30 adoptiva de las células transducidas con el TCR.

Como alternativa, la célula se puede aislar de un sujeto diferente, de forma que sea alogénica. La célula se puede aislar de un sujeto donante. Por ejemplo, si el sujeto se está sometiendo a un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (Alo-HSCT), la célula puede obtenerse a partir del donante, del que se obtienen las HSC. Si el

35 sujeto se está sometiendo o se ha sometido a un trasplante de órgano sólido, la célula puede obtenerse a partir del sujeto del que se obtuvo el órgano sólido.

Como alternativa, la célula puede ser, u obtenerse a partir de, una célula madre, tal como una célula madre hematopoyética (HSC). La transferencia génica en HSC no conduce a la expresión de TCR en la superficie celular, ya que las células madre no expresan las moléculas CD3. Sin embargo, cuando las células madre se diferencian hasta los precursores linfoides que migran hacia el timo, el inicio de la expresión de CD3 conduce a la expresión en la superficie del TCR introducido en los timocitos.

40

Una ventaja de este enfoque es que los linfocitos T maduros, una vez producidos, expresan solamente el TCR introducido y poco o nada de las cadenas del TCR endógeno, porque la expresión de las cadenas del TCR introducido inhibe el reordenamiento de los segmentos génicos del TCR endógeno para formar los genes alfa y beta del TCR funcional.

45

Un beneficio adicional es que las células madre modificadas genéticamente son una fuente continua de linfocitos T maduros con la especificidad antigénica deseada. Por lo tanto, la célula puede ser una célula madre modificada genéticamente, que, tras la diferenciación, produce un linfocito T que expresa un TCR del primer aspecto de la invención. La presente invención también proporciona un método para producir un linfocito T que expresa un TCR del primer aspecto de la invención induciendo la diferenciación de una célula madre que comprende una secuencia de nucleótidos según el segundo aspecto de la invención.

50

Una desventaja del enfoque de células madre es que los TCR con la especificidad deseada pueden eliminarse durante el desarrollo hasta linfocitos T en el timo, o pueden inducir tolerancia al expresarse en linfocitos T periféricos. Otro posible problema es el riesgo de mutagénesis por inserción en las células madre.

55

ENFERMEDADES ASOCIADAS A EBV

La presente divulgación también se refiere a un método para tratar y/o prevenir una enfermedad asociada a EBV en un sujeto que comprende la etapa de transferencia adoptiva de un linfocito T específico de EBV al sujeto.

5

El linfocito T específico de EBV puede reconocer la proteína LMP-2. El linfocito T específico de EBV puede reconocer el epítipo CLGGLTMV.

El término "prevenir" pretende referirse a evitar, retrasar, obstaculizar o dificultar la contracción de la enfermedad. El tratamiento puede prevenir o reducir, por ejemplo, la probabilidad de la infección por EBV.

10

"Tratar", como se usa en el presente documento, se refiere a cuidar de un sujeto enfermo, para mejorar, curar o reducir los síntomas de la enfermedad, o reducir o detener el avance de la enfermedad. También se refiere al tratamiento que hace al sujeto víricamente infectado no infeccioso para otros sujetos. El tratamiento puede reducir la carga vírica del EBV.

15

Los linfocitos T específicos de EBV pueden usarse para tratar cualquier afección asociada a EBV, en la que se expresa el antígeno LMP-2.

Por ejemplo, pueden usarse linfocitos T específicos de EBV en la gestión del linfoma de Hodgkin positivo a EBV, el carcinoma nasofaríngeo positivo a EBV o un trastorno linfoproliferativo postrasplante positivo a EBV (PTLD). PTLD aparece después de trasplantes de órganos sólidos (riñón, corazón, pulmón, hígado) y después de HSCT alogénico. El linfoma de Burkitt es la neoplasia infantil más común en África ecuatorial. Los tumores se localizan de forma característica en la mandíbula. Los estudios genéticos han mostrado que en África ecuatorial (donde el 95 % de los niños han sido infectados con EBV a la edad de 3), la gran mayoría de los linfomas de Burkitt se originan a partir de un linfocito infectado por EBV.

20

El linfoma de Hodgkin está caracterizado por la propagación ordenada de la enfermedad de un grupo de nodos linfáticos a otro, y por el desarrollo de síntomas sistémicos con enfermedad avanzada. Se encontró material genético del EBV en hasta el 50 % de los casos de linfoma de Hodgkin en ciertas zonas geográficas y poblaciones de pacientes.

25

El carcinoma nasofaríngeo es uno de los cánceres más comunes en el sur de China. Se origina en la nasofaringe, la región superior de la faringe o "garganta", donde los conductos nasales y los conductos auditivos unen el resto del tracto respiratorio superior.

30

Una enfermedad linfoproliferativa postrasplante (PTLD) se refiere a una categoría de afecciones que pueden desarrollarse en las personas tras un trasplante de órgano. El virus EBV se visto implicado en la mayoría de los casos de PTLD. Las manifestaciones pueden variar, variando de un número aumentado de linfocitos en el torrente sanguíneo a neoplasias de células sanguíneas, tales como linfoma de linfocitos B.

35

PTLD es una proliferación no controlada de linfocitos B tras una infección con el virus Epstein-Barr.

La depleción de linfocitos T por el uso de anticuerpos anti-linfocitos T en la prevención o tratamiento del rechazo a trasplante aumenta adicionalmente el riesgo de desarrollar un trastorno linfoproliferativo postrasplante.

40

PTLD policlonal puede formar masas tumorales y presentar síntomas debido a un efecto de la masa, por ejemplo, síntomas de obstrucción intestinal. Las formas monoclonales de PTLD tienden a formar un linfoma maligno diseminado.

45

PTLD puede revertirse espontáneamente con la reducción o cese de la medicación inmunosupresora, y también puede tratarse con adición de terapia anti-vírica.

50

El trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) es el trasplante de células madre sanguíneas obtenidas a partir de la médula ósea o sangre. El trasplante de células madre se realiza la mayoría de las veces para personas con enfermedades de la sangre, médula ósea, o ciertos tipos de cáncer.

55

Con la disponibilidad de los factores de crecimiento de células madre GM-CSF y G-CSF, la mayoría de procedimientos de trasplante de células madre hematopoyéticas se realizan actualmente mediante el uso de células

madre recogidas de la sangre periférica, en vez de la médula ósea. La recogida de células madre de sangre periférica proporciona un injerto mayor, no requiere que el donante se someta a anestesia general para recoger el injerto, da como resultado un tiempo más corto para realizar el injerto, y puede proporcionar una tasa de recidiva inferior a largo plazo.

5

El trasplante de células madre hematopoyéticas sigue siendo un procedimiento arriesgado con muchas posibles complicaciones; tradicionalmente se ha reservado para pacientes con enfermedades potencialmente mortales. Aunque ocasionalmente se usó de manera experimental en indicaciones que no eran malignas ni hematológicas, tales como una enfermedad autoinmunitaria incapacitante grave y enfermedad cardiovascular, el riesgo de complicaciones mortales parece demasiado elevado para obtener mayor aceptación.

10

Muchos receptores de HSCT son pacientes de mieloma múltiple o de leucemia que no se beneficiarían del tratamiento prolongado con, o ya son resistentes a, la quimioterapia. Los candidatos para HSCT incluyen casos pediátricos en los que el paciente tiene un defecto congénito, tal como una inmunodeficiencia combinada grave o neutropenia congénita con células madre defectuosas, y también niños o adultos con anemia aplásica que han perdido sus células madre tras el nacimiento. Otras afecciones tratadas con trasplantes de células madre incluyen anemia de células falciformes, síndrome mielodisplásico, neuroblastoma, linfoma, sarcoma de Ewing, tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas y enfermedad de Hodgkin. Más recientemente, se han desarrollado procedimientos no mieloablativos, denominados "mini trasplantes", que requieren dosis más pequeñas de quimioterapia y radioterapia preparativas. Esto ha permitido que el HSCT se realice en ancianos y otros pacientes que de otra manera se considerarían demasiado débiles para resistir un régimen de tratamiento convencional.

15

20

Además, se han desarrollado Alo-HSCT con acondicionamiento de intensidad reducida sumamente inmunodepresores (o con eliminación de linfocitos T). Estos enfoques reducen la toxicidad del trasplante en pacientes ancianos con más comorbilidades.

25

El HSCT alogénico implica a dos personas: el donante (sano) y el receptor (paciente). Los donantes de HSC alogénicas deben tener un tipo de tejido (HLA) que coincida con el receptor. La coincidencia se realiza basándose en la variabilidad en tres o más loci del gen (HLA), y se prefiere una coincidencia perfecta en estos loci. Incluso si existe una buena coincidencia en estos alelos críticos, el receptor requerirá medicamentos inmunodepresores para mitigar la enfermedad del injerto contra el huésped. Los donantes de trasplantes alogénicos pueden estar emparentados (normalmente un hermano que coincide estrechamente en HLA), ser singénicos (un gemelo monocigótico o "idéntico" del paciente - necesariamente extremadamente poco frecuente debido a que pocos pacientes tienen un gemelo idéntico, pero ofrecen una fuente de células madre perfectamente coincidentes en HLA) o no emparentados (donante que no está emparentado y que se ha descubierto que tiene un grado muy estrecho de coincidencia de HLA). Aproximadamente del 25 al 30 % de receptores de HSCT alogénicos tienen un hermano idéntico en HLA. Los trasplantes alogénicos también se realizan mediante el uso de sangre de cordón umbilical como fuente de células madre. En general, al trasplantar células madre sanas al sistema inmunitario del receptor, los HSCT alogénicos parecen mejorar la probabilidad de curación o remisión a largo plazo, una vez que se resuelven las complicaciones inmediatas relacionadas con el trasplante.

30

35

40

El sujeto puede ser un sujeto humano. En particular, el sujeto puede ser un receptor de trasplante.

La invención se describirá adicionalmente a continuación por medio de los Ejemplos, que pretenden servir para ayudar a un experto en la técnica a realizar la invención, y no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la invención.

45

Ejemplos

50 Ejemplo 1 - Construcción de un vector retroviral para administrar genes de TCR específicos de EBV

Una cuestión importante para la terapia génica de TCR es la selección de los vectores capaces de una expresión a nivel elevado y sostenida en los linfocitos T. Son necesarios niveles de expresión elevados para permitir que el TCR introducido compita con el TCR endógeno por una reserva limitada de moléculas CD3. Los requisitos adicionales para la terapia génica de TCR son (i) una eficacia de transducción de hasta un 30 % con una manipulación ex vivo mínima, (ii) la ausencia de vectores competentes de replicación, y (iii) la expresión estable del TCR a lo largo del tiempo para permitir el desarrollo de memoria.

55

- En este estudio se usó la estructura del vector MP71 con una secuencia de TCR con optimización de los codones y una cisteína adicional en cada región constante de las cadenas alfa y beta para mejorar la expresión génica y minimizar los emparejamientos incorrectos con las cadenas del TCR endógeno. La estructura del vector MP71 se ha descrito previamente (Hildigner y col. (1999) J. Virol. 73: 4083-4089). La LTR del vector MP71 se obtiene a partir del virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV), y la secuencia líder (LS) se obtiene a partir del virus de células madre embrionarias de ratón (MESV). La secuencia líder se diseñó para aumentar la seguridad del vector en las aplicaciones clínicas. Se han eliminado todos los codones ATG para disminuir el riesgo de posible producción de proteínas/péptidos y reducir la probabilidad de recombinación homóloga con secuencias retrovirales endógenas. La expresión de los genes insertados en MP71 se aumenta mediante un sitio aceptor mínimo de splicing en el extremo 3' de la secuencia líder. El vector MP71 original contuvo un elemento de respuesta de la hepatitis de marmota (WPPE) de longitud completa para aumentar la expresión génica a nivel post-transcripcional. El vector MP71 que contenía un WPPE truncado con codones ATG mutados se usa actualmente en Alemania en un ensayo clínico que usa linfocitos T modificados genéticamente en pacientes con VIH.
- Los presentes inventores han modificado adicionalmente el vector MP71 y las variantes ensayadas sin ninguna secuencia de WPPE. El vector comprende los genes alfa y beta de TCR de EBV, unidos por medio de una secuencia de teschovirus porcino 2A autoescindible interna, como se muestra en la figura 1. Los genes de TCR alfa y beta se sintetizaron basándose en el uso de TCR dominante en los clones de CTL específicos de LMP-2 de EBV. La secuencia de aminoácidos para el producto TCR alfa-2A-TCR beta se proporciona como la SEQ ID No. 8, y su secuencia codificante se proporciona como la SEQ ID No. 9.

Ejemplo 2 - Producción de linfocitos T humanos transducidos con TCR específicas de LMP-2 de EBV

- Se transdujeron genes de receptores de linfocitos T (TCR) humanos específicos para EBV en linfocitos T humanos mediante el uso de vectores retrovirales que portaban los genes de TCR deseados. En resumen, se transfectaron células de empaquetamiento anfótropas que expresaban los genes gag-pol retrovirales con los vectores retrovirales de TCR especificados mediante el uso del método de precipitación con fosfato cálcico. Tras la transfección retroviral, el medio de transfección se cambió por medio de linfocitos T humanos para la recogida del sobrenadante retroviral. El sobrenadante retroviral recogido que contenía las partículas víricas que expresaban los genes de TCR deseados se usó después para infectar/transducir linfocitos T humanos activados. 24 horas más tarde, los genes de TCR introducidos se expresan sobre la superficie de los linfocitos T transducidos, y se pueden detectar mediante tinción de FACS.

- La transferencia retroviral del TCR específico de LMP-2 da como resultado la expresión del TCR sobre la superficie de los linfocitos T receptores como se determina mediante tinción de péptidos/tetrámeros del MHC y tinción con anticuerpo anti-Vβ13 (figura 2).

Ejemplo 3 - Tinción de citocina intracelular de linfocitos T transducidos con TCR

- Para demostrar la actividad específica del antígeno funcional, los presentes inventores realizaron ensayos de estimulación específica con antígenos y de tinción de citocinas intracelulares.

- Se incubaron linfocitos T transducidos con TCR (2×10^5) con 2×10^5 células estimuladoras T2 revestidas con péptido relevante 100 mM (pCLG: CLGGLTMV) o irrelevante (pNLV: NLVPMVATV) en 200 ml de medio de cultivo que contenía brefeldina A (Sigma-Aldrich) a 1 mg/ml. Tras un periodo de incubación de 18 h a 37 °C con CO₂ al 5 %, las células se tiñeron en primer lugar para CD8 o CD4 superficial y después se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron para IFNγ, IL2 y TNFα intracelulares mediante el uso del kit Fix & Perm (Caltag) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se introdujeron en un citómetro de flujo LSR II y los datos se analizaron usando el programa informático FACSDiva (BD Biosciences).

- Los resultados se muestran en las figuras 3 y 4.

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de linfocitos T (TCR) que se une a un péptido de la proteína latente de membrana 2 (LMP-2) del virus Epstein Barr (EBV) que tiene la secuencia aminoacídica CLGGLTMMV (SEQ ID No. 1) cuando se presenta por una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), en el que cada una de la cadena $\alpha\beta$ y la cadena β comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) y la secuencia de cada CDR3 es como se indica a continuación:
 - CDR3 α - FCAMREGSGSARQLTFGSGTQLTVLPD (SEQ ID No. 2)
 - CDR3 β - ASSLGPAIGETQYFGPGTRLLVL (SEQ ID No. 3)
 o una variante de aquellas secuencias que tienen hasta tres cambios de aminoácidos.
2. Un TCR de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cadena α comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:
 - CDR α - TSDQSYG (SEQ ID No. 4)
 - CDR2 α - QGSYDEQ (SEQ ID No. 5)
 - CDR3 α - FCAMREGSGSARQLTFGSGTQLTVLPD (SEQ ID No. 2)
 en el que la cadena α comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:
 - CDR1 β - SSHAT (SEQ ID No. 6)
 - CDR2 β - FNYEAQ (SEQ ID No. 7)
 - CDR3 β - ASSLGPAIGETQYFGPGTRLLVL (SEQ ID No. 3).
 o variantes de aquellas secuencias que tienen hasta tres cambios de aminoácidos.
3. Un TCR de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID No. 8 o una variante de la misma que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos.
4. Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena α de un TCR de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.
5. Una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende las bases 1-810 de la SEQ ID No. 9, o una variante de la misma que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia.
6. Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena β de un TCR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
7. Una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende las bases 886-1812 de la SEQ ID No. 9 o una variante de la misma que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia.
8. Una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 4 y 6 que codifica una cadena α de TCR unida a una cadena β de TCR.
9. Una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 8, que tiene la secuencia mostrada como la SEQ ID No. 9 o una variante de la misma que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia.
10. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
11. Una célula que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9.

12. Un método para producir una célula de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende la etapa transducir una célula *in vitro* o *ex vivo* con un vector de acuerdo con la reivindicación 10.

13. Un vector de acuerdo con la reivindicación 10 o una célula de acuerdo con la reivindicación 11, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad asociada a EBV en un sujeto.

14. Una composición farmacéutica que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 10 o una célula de acuerdo con la reivindicación 11.

Figura 1

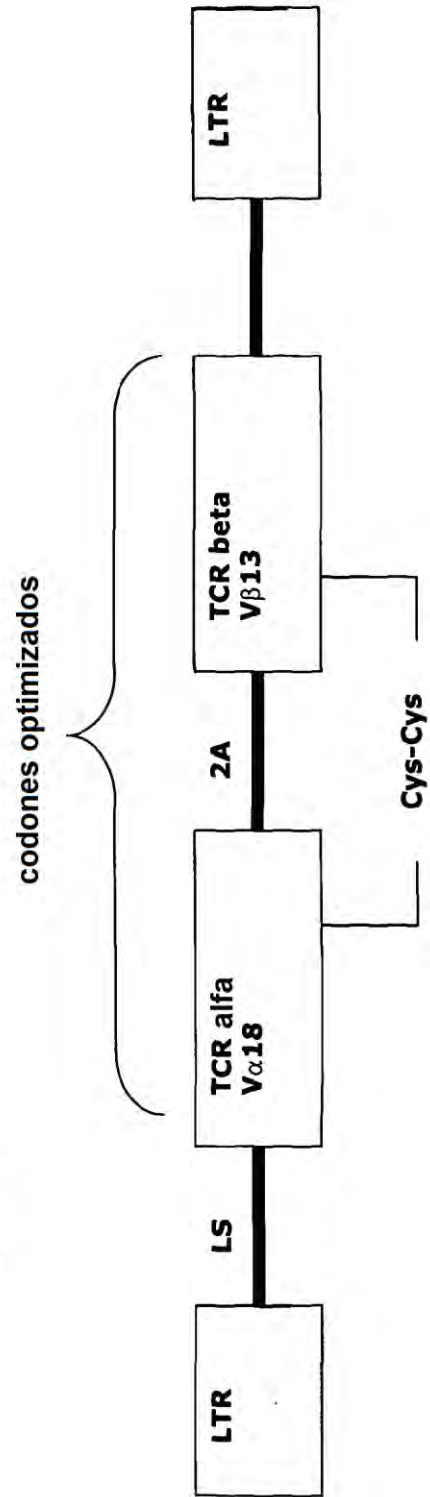


Figura 2

