

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 495**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2013 PCT/US2013/039812**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13169691**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2013 E 13787935 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2847223**

54 Título: **Anticuerpo dirigido contra b7-h6, proteínas de fusión, y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

07.05.2012 US 201261643456 P
25.09.2012 US 201261705227 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.07.2019

73 Titular/es:

TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE (100.0%)
Technology Transfer Office 11 Rope Ferry Road
Hanover, NH 03755-1404, US

72 Inventor/es:

SENTMAN, CHARLES, L. y
ZHANG, TONG

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 719 495 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

Anticuerpo dirigido contra b7-h6, proteínas de fusión, y métodos de uso de los mismos

5 **Antecedentes de la invención**

10 Linfocitos citolíticos naturales (NK) son los linfocitos del sistema inmunitario innato que participan en la eliminación de las células tumorales. En seres humanos, los receptores de citotoxicidad activadores naturales (NCR) NKp30, NKp44, y NKp46 tienen un papel principal en la lisis de células tumorales mediadas por tumor. NKp30 reconoce B7-H6, un miembro de la familia B7. Como todos los miembros conocidos de la familia B7, B7-H6 incluye dos dominios Ig con intrones en la fase 1 adyacentes en la región extracelular. Es importante destacar que, B7-H6 no se detecta en los tejidos humanos normales pero se expresa de forma selectiva en una gran variedad de líneas de células tumorales humanas, incluidos los linfomas T y B, melanomas, y carcinomas (Brandt, et al. (2009) J. Exp. Med. 206:1495-1503). Adicionalmente, la expresión de B7-H6 sobre las células tumorales desencadena la citotoxicidad celular específica de NKp30 y la secreción de citoquinas. Por lo tanto, B7-H6 funciona como una automolécula inducida por tumores que altera la inmunidad innata a una transformación celular mediante su interacción con el receptor activador NKp30 (Brandt, et al. (2009) *supra*).

20 El documento WO 2011/070443 A1 describe anticuerpos monoclonales que se unen a B7H6 y usos de los mismos.

Ramos et al., divulgan 'Chimeric Antigen Receptor (CAR) - Engineered Lymphocytes for Cancer Therapy' (Expert Opinion on Biological Therapy, vol. 11, n.º 7, 1 de julio de 2011, páginas 855-873).

25 **Sumario de la invención**

La invención es un receptor de antígeno quimérico, que incluye un fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo que se une específicamente a B7 homólogo 6, una región transmembrana y un dominio de señalización del receptor de linfocitos T intracelular. En algunas realizaciones, la región transmembrana y el dominio de señalización del receptor de linfocitos T intracelular se obtienen de CD3 zeta. En otras realizaciones, el receptor de antígeno quimérico incluye además un dominio de señalización intracelular de un receptor de una proteína inmunoestimuladora.

35 La invención proporciona adicionalmente un encajador de linfocitos T biespecífico que incluye un anticuerpo que se une específicamente a B7, homólogo 6, y un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno de linfocitos T, en el que en algunas realizaciones el antígeno de linfocitos T es CD3.

40 La invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende el receptor de antígeno quimérico o el encajador de linfocitos T biespecífico como se ha descrito anteriormente y un transportador farmacéuticamente aceptable.

Aún más, la presente invención proporciona el receptor de antígeno quimérico del encajador de linfocitos T biespecífico como se ha descrito anteriormente para su uso como medicamento.

45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del receptor de antígeno quimérico o el encajador de linfocitos T biespecífico como se ha descrito anteriormente para su uso en la destrucción o inhibición del crecimiento de células que expresan B7, homólogo 6.

50 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del receptor de antígeno quimérico o el encajador de linfocitos T biespecífico como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de una enfermedad o dolencia asociada con una expresión elevada de B7 homólogo 6.

55 La descripción proporciona un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo, que se une específicamente a B7, homólogo 6 (B7-H6), en el que las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de la cadena pesada son como se definen en la SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 7, respectivamente; y las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de la cadena ligera son como se definen en la SEQ ID NO:8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10, respectivamente. En un ejemplo, el anticuerpo tiene un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:3. En otro ejemplo, el anticuerpo tiene un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:4. En otros ejemplos, el anticuerpo está humanizado. En otros ejemplos adicionales, el anticuerpo está conjugado con una molécula sintética tal como una etiqueta, agente citotóxico, o radioisótopo terapéutico. En otros ejemplos más, el anticuerpo es un receptor de antígeno quimérico y la molécula sintética incluye una región transmembrana, un dominio de señalización del receptor de linfocitos T intracelular, por ejemplo, obtenido de CD3 zeta, y un dominio intracelular opcional de un receptor de proteína coestimuladora. En otros ejemplos, el anticuerpo es un encajador de linfocitos T biespecífico y la molécula sintética incluye un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno de linfocitos T, *por ejemplo*, CD3. Se proporciona una composición farmacéutica que incluye el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y un transportador farmacéuticamente aceptable, en forma de un kit que

contiene el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, conjugado a una etiqueta.

Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 muestra la estructura de un anticuerpo dirigido contra CAR de B7H6.
 La Figura 2 muestra que el receptor de antígeno quimérico (CAR) de NKp30 y linfocitos T dirigidos contra CAR de B7H6 son sensibles a células para el ligando NKp30 mediante la producción de IFN- γ . Los linfocitos T que expresan B7-H6 natural (WT), anticuerpo dirigido contra CAR de B7-H6 (aB7H6-28-z), o una proteína de fusión zeta NKp30-CD28-CD3 (30-28-z) se pusieron en contacto con medio, células RMA, células RMA que expresan B7-H6 o células K562 (10^5 células) (Figura 2A), o con células mononucleares de sangre periférica (PBMC, 10^5 células) o DC inmaduras (iDC, 2×10^4 células) (Figura 2B) durante 24 horas y se midió el nivel de producción de IFN gamma con ELISA. Los resultados se muestran como promedio + SD.
 La Figura 3 muestra la expresión de HLA-DR, CD83, CD86, ligandos NKp30, y B7-H6 sobre células dendríticas inmaduras (iDC) y células dendríticas maduras (mDC).
 15 La Figura 4 muestra la expresión de B7H6 (usando anticuerpos monoclonales dirigidos contra B7H6) y ligandos NKp30 (usando NKp30-Ig soluble) sobre varias líneas de células humanas y RMA de ratón y células RMA-B7H6 en comparación con la tinción del control de Isotipo. La Figura 5 muestra que los linfocitos T anti-CAR de B7H6 modificados aumentan la supervivencia de ratones con linfoma RMA/B7H6 después del tratamiento *in vivo*. Los ratones B6 se inocularon con células RMA/B7H6 (10^5 , i.v., día 0). Se administraron células transducidas de forma simulada o linfocitos T anti-CAR de B7H6 modificados (5×10^6 , i.v., día 5, 7, 9 (Figura 5A)). Los datos se presentaron en curvas de supervivencia Kaplan-Meier. Los datos mostrados eran combinaciones de dos experimentos independientes (Figura 5B). Los ratones no tratados y supervivientes (de la Figura 5B) se volvieron a estimular con 10^4 RMA por vía subcutánea (sin expresión de B7H6) y el área del tumor se midió en días alternos (Figura 5C). Estos datos muestran que los ratones supervivientes después de la terapia con CAR fueron resistentes al mismo tumor, lo que indica una inducción de una respuesta inmunitaria contra otros antígenos tumorales ya que las células RMA no expresan B7H6.
 La Figura 6 muestra la estructura y actividad de un BiTE anti-B7H6. La Figura 6A representa gráficamente la fusión entre el scFv de un anticuerpo dirigido contra B7H6 y el scFv de un anticuerpo dirigido contra CD3 (OKT3). VH, región variable de la cadena pesada; VL, región variable de la cadena ligera; y L, enlazador. La Figura 6B muestra que el medio condicionado que contiene este BiTE desencadena una destrucción sólida de células tumorales B7H6+ por los linfocitos T humanos dirigidos contra células tumorales que expresan B7H6 (RMA-B7H6, K562) pero no contra las células tumorales que no lo expresan (RMA). PBMC activadas con OKT3 se cultivaron simultáneamente con líneas de células tumorales en una relación E:T (relación entre células efectores y células dianas) de 5:1 en un medio condicionado diluido de 1 a 4 que contienen el anti-B7H6 BiTE o el medio de control. Cinco horas después del cultivo simultáneo, se recogieron sobrenadantes celulares, y la citotoxicidad se determinó mediante un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).
 La Figura 7 proporciona datos, que muestra que las proteínas BiTE anti-B7H6 desencadenan la secreción de IFN- γ . Figura 7A, los linfocitos T humanos activados con OKT3 se cultivaron simultáneamente con líneas de células tumorales en una relación E:T 1:1 (10^5 : 10^5) en varias concentraciones de huBiTE1. Los sobrenadantes se recogieron después de 24 horas y las concentraciones de IFN- γ se determinaron mediante ELISA. Figura 7B, los linfocitos T activados con OKT3 se cultivaron simultáneamente con células tumorales en una relación E:T de 4:1, 1:1, o 0,25:1. HuBiTE1 se añadió al cultivo simultáneo a una concentración de 250 ng/ml. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron después de 24 horas. Las concentraciones de IFN- γ se midieron mediante ELISA. La Figura 7C muestra que el medio condicionado que contiene un anticuerpo BiTE dirigido contra B7H6 que activa los linfocitos T de ratón dispara sólidos IFN- γ de linfocitos T de ratón cuando se cultivan simultáneamente con células tumorales que expresan B7H6. Esplenocitos de ratón activados con ConA se cultivaron simultáneamente con líneas de células tumorales en una relación E:T de 5:1 (para B16F10 y B16F10/B7H6, 10^5 : 2×10^4) o 1:1 (para K562, 10^5 : 10^5) en un medio condicionado diluido 1 a 4 de células 293F transfectadas con plásmido Bitel de ratón o sobrenadante del control. Después del cultivo simultáneo (24 horas), los sobrenadantes se recogieron y las concentraciones de IFN- γ se determinaron mediante ELISA.
 La Figura 8 muestra que el BiTE1 de ratón (BiTE anti-B7H6) activó específicamente linfocitos T de ratón para destruir las células tumorales B7H6+. Esplenocitos de ratón activados con ConA se cultivaron simultáneamente con una mezcla de RMA (premarcadas con CSFE 0,1 μ M) y RMA-B7H6 (premarcadas con CSFE 1 μ M) (50 %RMA+50 %RMA-B7H6; Figura 8A) o una mezcla de B16F10 y B16F10-B7H6 (50 %B16F10+50 %B16F10-B7H6; Figura 8B) en una relación E:T 1:1, 5:1, y 10:1. Ocho horas y 24 horas después, las células se recogieron y la identidad de las células vivas se determinó mediante citometría de flujo. La lisis específica de células B7H6+ se calculó basándose en la relación normalizada del grupo del control de relación RMA:RMA-B7H6 o B16F10:B16F10-B7H6 de cada grupo experimental.

60 Descripción detallada de la invención

Para dirigirse a B7-H6 en el tratamiento del cáncer, Se generaron dos anticuerpos monoclonales (mAb) derivados de ratón que reconocen específicamente B7-H6. Ambos clones eran de la subclase IgG2a. Se aislaron los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del clon de mAb 47.39. Se determinaron los nucleótidos y se dedujeron los aminoácidos. Usando estas secuencias, se generó un receptor de antígeno quimérico (CAR), que incluía las porciones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) del mAb 47.39. Específicamente, el anticuerpo dirigido

- contra CAR de B7H6 incluyó un fragmento variable monocatenario (scFv) que reconoce B7-H6, seguido por una porción de molécula CD28 (que incluye los dominios bisagra, transmembrana y citoplásmico) y la región citoplásmica de CD3zeta (Figura 1). Usando citometría de flujo, se confirmó que este CAR podría reconocer la molécula B7-H6. Adicionalmente, se ha descubierto que los niveles linfocitos T que expresan el anticuerpo dirigido contra CAR de B7H6 produjo elevados niveles de IFN gamma en respuesta a la estimulación con células positivas para B7-H6, es decir, células de leucemia mielógena K562 y células RMA que expresan B7-H6 (Figura 2A), mientras que la PBMC e iDC autólogas no responden al anticuerpo dirigido contra CAR de B7H6 (Figura 2B). Los datos de citometría de flujo mostraron que las células dendríticas (DC) no expresan B7-H6 sobre la superficie celular (Figura 3), mientras que las líneas de células cancerosas como K562, U937, A375, Hela, T47D, y Panc-1 expresan B7-H6 (Figura 4) y dicha expresión se correlaciona con la expresión de NKp30. A este respecto, a diferencia del CAR de tipo NKp30, el anti-CAR de B7H6 no mostró reactividad contra células dendríticas autólogas. Adicionalmente, el anti-CAR de B7H6 mostró redirigir los linfocitos T para lisar específicamente las células tumorales positivas para B7H6 pero no las células tumorales negativas para B7H6. La transferencia adoptiva de linfocitos T de murino que expresan el CAR específico de B7H6 dieron como resultado una mejora en la supervivencia de ratones C57BL/6 que se había infundido cinco días antes con células de linfoma B7H6+ (Figuras 5A y 5B). Además, los ratones que sobrevivieron al primer estímulo con células de linfoma B7H6+ demostraron inmunidad después de un estímulo adicional con células de linfoma B7H6+ (Figura 5C). Por lo tanto, esto demuestra el uso de un CAR específico de B7H6 para la inmunoterapia adoptiva con linfocitos T dirigida contra tumores B7H6+.
- Además de un anti-CAR de B7H6, se generó un anticuerpo BiTE (encajador de linfocitos T biespecífico) dirigido contra B7H6/CD3 (Figura 6A). Se produjeron las versiones humana y de ratón del BiTE dirigido contra B7H6 (es decir, huBiTE1 y muBiTE1, respectivamente) y ambas fueron capaces de lisar específicamente tumores B7H6+ (Figuras 6B, 8A y 8B). Además, las versiones tanto humana como de ratón del BiTE dirigido contra B7H6 desencadenaron la secreción de IFN- γ en linfocitos T y en un cultivo simultáneo de células tumorales (Figuras 7A-7C).
- Por lo tanto, la presente descripción proporciona un anticuerpo que tiene especificidad por B7-H6, en el que el anticuerpo tiene una cadena pesada codificada mediante la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1 y una cadena ligera cadena pesada codificada mediante la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:2. Además, la descripción proporciona un anticuerpo que tiene especificidad por B7-H6, en el que el anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID NO:3 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEQ ID NO:4. Más particularmente, la descripción proporciona un anticuerpo que se une específicamente a B7-H6, en el que la región variable de la cadena pesada del anticuerpo tiene una secuencia de CDR1 de Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-Gly-Tyr-Trp (SEQ ID NO:5), secuencia de CDR2 de Ile-Leu-Pro-Gly-Thr-Gly-Ser-Thr (SEQ ID NO:6), y secuencia de CDR3 de Ala-Ile-Pro-Gly-Pro-Met-Asp-Tyr (SEQ ID NO:7); y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo tiene una secuencia de CDR1 de Gln-Asp-Ile-Asn-Ser-Tyr (SEQ ID NO:8), secuencia de CDR2 de Arg-Ala-Asn (SEQ ID NO:9) y secuencia de CDR3 de Leu-Gln-Tyr-Asp-Glu-Phe-Pro-Tyr-Thr (SEQ ID NO: 10). En algunos ejemplos, el anticuerpo puede incluir una cadena pesada de SEQ ID NO:3 junto con cualquier cadena ligera adecuada, tales como las descritas en los documentos US 2004/0152105, PCT/US2000/030039 (publicada como WO 01/34768 A2) y PCT/IB2010/003411 (publicada como WO 2011/070443 A1). Del mismo modo, el anticuerpo puede incluir una cadena ligera de SEQ ID NO:4 junto con cualquier cadena pesada adecuada, tales como las descritas en los documentos US 2004/0152105, PCT/US2000/030039 (publicada como WO 01/34768 A2) y PCT/IB2010/003411 (publicada como WO 2011/070443 A1).
- El anticuerpo puede ser un anticuerpo aislado que tiene especificidad por B7-H6 humano y puede ser un anticuerpo de longitud completa, o un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede ser policlonal, monoclonal, recombinante, quimérico, o humanizado. Adicionalmente, el anticuerpo puede ser de cualquier isotipo incluidos aunque sin limitación, IgA, IgD, IgE, IgG, o IgM. Por lo tanto, por ejemplo, el anticuerpo puede ser cualquier IgA tal como IgA1 o IgA2, o cualquier IgG tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, o IgG sintética. El anticuerpo también puede ser cualquier fragmento de anticuerpo con especificidad por B7-H6, tal como F(ab)₂, Fv, scFv, F(ab')₂, F(ab), VL, VH, dsFv, Fv, scFv-Fc, (scFv)₂, un diacuerpo, y un anticuerpo bivalente. El anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo modificado o sintético, incluidos, aunque no de forma limitativa, anticuerpos no de IgG sin agotamiento, T-cuerpos, u otras variantes Fc o Fab de anticuerpos.
- Además de una cadena pesada de SEQ ID NO:3, el anticuerpo de la descripción incluye además una cadena ligera seleccionada de una biblioteca de Fab usando intercambio de cadena secuencial no tratada. Del mismo modo, además de una cadena ligera de SEQ ID NO:4, el anticuerpo de la descripción puede incluir además una cadena pesada seleccionada de una biblioteca de Fab usando intercambio de cadena secuencial no tratada.
- En algunos ejemplos, la descripción proporciona un anticuerpo con avidez por B7-H6 de aproximadamente 10 μ M o menos, 5 μ M o menos, 2 μ M o menos, 1 μ M o menos, 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, o 200 nM o menos. La descripción también proporciona un anticuerpo con avidez por B7-H6 de aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, o aproximadamente 5 nM o menos. La avidez se puede medir usando técnicas conocidas en la materia, tales como ELISA o BIACORE.

El anticuerpo de la descripción se puede producir mediante cualquier técnica adecuada, por ejemplo, usando cualquier sistema de expresión adecuado en células eucariotas o no eucariotas. En algunos ejemplos, el anticuerpo se produce usando un sistema de expresión en mamífero. En algunos ejemplos, la cadena pesada se puede codificar mediante una secuencia de ARN tal como la SEQ ID NO:1, mientras que la cadena ligera se puede codificar mediante una secuencia de ADN tal como la SEQ ID NO:2.

El anticuerpo de la descripción se puede producir usando un sistema de expresión no eucariota adecuado tal como un sistema de expresión en bacterias. Los sistemas de expresión en bacterias se pueden usar para producir fragmentos tales como F(ab)₂, Fv, scFv, F(ab')₂, F(ab), VL, VH, dsFv, Fv, scFv-Fc, (scFv)₂, y diacuerpos. Las técnicas para alterar las secuencias de codificación del ADN para producir dichos fragmentos son conocidas en la técnica.

El anticuerpo de la descripción se puede conjugar con una molécula sintética usando cualquier tipo de conjugación adecuada. Se puede usar diseño genético recombinante y la incorporación de selenocisteína (por ejemplo, como se describe en el documento WO 2008/122039) para su conjugación con una molécula sintética. Otros métodos de conjugación pueden incluir el acoplamiento covalente con las aminas de la cadena secundaria de lisina o los tioles de la cadena secundaria de cisteína tanto naturales como diseñadas mediante ingeniería genética. Véase, por ejemplo, Wu, et al. (2005) Nat. Biotechnol. 23:1137-1146. La molécula sintética puede ser cualquier molécula tal como una que se dirige a un tumor. Por supuesto, se entenderá que la molécula sintética también puede ser una proteína o un anticuerpo, en el que la proteína de fusión resultante se puede producir mediante sistemas y métodos de expresión de proteínas recombinantes convencionales.

A este respecto, un aspecto de la invención proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR). Los CAR, también conocidos como receptores de linfocitos T artificiales, receptores de linfocitos T quiméricos, o inmunorreceptores quiméricos, son receptores diseñados mediante ingeniería genética, que injertan una especificidad arbitraria sobre una célula inmunitaria efectora. Por lo general, estos receptores se utilizan para injertar la especificidad de un anticuerpo monoclonal en un linfocito T, por ejemplo, mediante un vector de expresión retroviral. La forma más habitual de estas moléculas son las fusiones de scFv derivadas de anticuerpos monoclonales, fusionados con una transmembrana CD3-zeta y un endodominio, es decir, un dominio de señalización del receptor de linfocitos T intracelular (TCR). Dichas moléculas dan como resultado la transmisión de una señal zeta en respuesta al reconocimiento mediante el scFv de su diana. Los CAR de "primera generación" tienen, de forma típica, el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3, que es el transmisor primario de las señales procedentes de los TCR endógenos. Los CAR de "segunda generación" añaden dominios de señalización intracelular procedentes de varios receptores de proteínas coestimuladoras (por ejemplo, CD28, 41BB, ICOS) a la cola citoplasmática del CAR para proporcionar señales adicionales al linfocito T (Véase la Figura 1A). Los estudios preclínicos han indicado que la segunda generación de diseños CAR mejora la actividad antitumoral de los linfocitos T (Maher, et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:70-75; Kowolik, et al. (2006) Cancer Res. 66:10995-11004). Más recientemente, los CAR de "tercera generación" combinan múltiples dominios de señalización, tales como CD3z-CD28-41BB o CD3z-CD28-OX40, para aumentar más la potencia (Zhao, et al. (2009) J. Immunol. 183:5563-5574; Pule, et al. (2005) Mol. Ther. 12:933-941; Zhong, et al. (2010) Mol. Ther. 18:413-420). Por consiguiente, en una realización de la presente invención, el fragmento scFv del anticuerpo dirigido contra B7-H6 se incluye en un CAR.

Los CAR de la presente invención se pueden preparar usando técnicas de proteína recombinante convencionales que utilizan secuencias de CD3-zeta y otras moléculas coestimuladoras conocidas en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de CD3-zeta humana está disponible con el número de registro de GenBank NP_932170, la secuencia de CD28 humana está disponible con el número de registro de GenBank NP_006130, la secuencia de OX40 humana está disponible con el número de registro de GenBank NP_003318, y la secuencia de CD19 humana está disponible con el número de registro de GenBank AAA69966. En realizaciones particulares, el CAR de la presente invención incluye un dominio citoplásmico CD3ζ humano (aminoácidos 52-164; SEQ ID NO:11), dominios bisagra-transmembrana-citoplásmico de CD28 humana (aminoácidos 135-220; SEQ ID NO:12), y opcionalmente una porción de CD19 (aminoácidos 1-327; SEQ ID NO: 13).

Otras moléculas sintéticas incluyen agentes terapéuticos, tales como agentes citotóxicos, citostáticos o antiangiogénicos y radioisótopos. Un agente citotóxico puede ser una molécula vegetal, fúngica, o bacteriana (por ejemplo, una toxina de proteína). Un agente terapéutico puede ser un maitansinoide (por ejemplo, maitansinol o DM1 maitansinoide), un taxano, o una caliqueamicina. Los agentes terapéuticos incluyen vincristina y prednisona. Un agente terapéutico puede ser un antimetabolito (por ejemplo, un antifolato tal como metotrexato, una fluoropirimidina tal como 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina, o un análogo de purina o adenosina); un agente intercalante (por ejemplo, una antraciclina tal como doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarrubicina, mitomicina-C, dactinomicina, o mitramicina); un derivado de platino (por ejemplo, cisplatino o carboplatino); un agente alquilante (por ejemplo, mostaza de nitrógeno, melfalán, clorambucil, busulfano, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas o tiotepa); un agente antimetabólico (por ejemplo, un alcaloide de la vinca tal como vincristina o un taxoide tal como paclitaxel o docetaxel); un inhibidor de la topoisomerasa (por ejemplo, etopósido y tenipósido, amsacrina, topotecán); un inhibidores del ciclo celular (por ejemplo, un flavopiridol); o un agente de microtúbulos (por ejemplo, una epotilona, un análogo de discodermolia, o un análogo de eleuterobina). Un agente terapéutico que puede ser un inhibidor del proteosoma o un inhibidor de la topoisomerasa tal como bortezomib, amsacrina, etopósido, fosfato de

etopósido, tenipósido, o doxorubicina. Los radioisótopos terapéuticos incluyen itrio (^{90}Y), lutecio (^{177}Lu), actinio (^{225}Ac), praseodimio, astatina (^{211}At) renio (^{186}Re), bismuto (^{212}Bi o ^{213}Bi), y rodio (^{188}Rh). Los agentes antiangiogénicos incluyen linomida, bevacuzimab, angiostatina, y razoxano. La molécula sintética puede ser otro anticuerpo tal como rituximab o bevacuzimab.

5 Una molécula sintética también puede ser una etiqueta. Las etiquetas pueden ser útiles en aplicaciones diagnósticas y pueden incluir, por ejemplo, agentes de contraste. Un agente de contraste puede ser una etiqueta de radioisótopo tal como yodo (^{131}I o ^{125}I) indio (^{111}In), tecnecio (^{99}Tc), fósforo (^{32}P), carbono (^{14}C), tritio (^3H), otros radioisótopos (por ejemplo, un ion radioactivo) o un radioisótopo terapéutico anteriormente relacionado. Adicionalmente, los agentes de
10 contraste pueden incluir materiales radioopacos, agentes para formación de imágenes por resonancia magnética (IRM), agentes para formación de imágenes por ultrasonidos, y cualesquiera otros agentes de contraste adecuados para la detección mediante un dispositivo de obtención de imágenes de un cuerpo animal. Una molécula sintética también puede ser una etiqueta fluorescente, una etiqueta enzimática biológicamente activa, una etiqueta luminiscente, o una etiqueta de cromóforo.

15 Además, una molécula sintética también puede ser una nanopartícula magnética, una nanopartícula de polímero de liberación controlada o composición lipídica. Las nanopartículas magnéticas incluyen, aunque no de forma limitativa, hierro (por ejemplo, Fe_3O_4 o Fe_2O_4), cobalto, cinc, cadmio, níquel, gadolinio, cromo, cobre, manganeso, terbio, europio, oro, plata, platino, o aleaciones de los mismos. Las nanopartículas de polímero de liberación controlada se
20 pueden producir usando métodos convencionales a partir de polímeros biodegradables o no biodegradables, *por ejemplo*, poli(ácido láctico), derivados de poli(ácido láctico), poli(ácido láctico)PEGilado, poli(ácido láctico-co-glicólico), derivados de poli(ácido láctico-co-glicólico), poli(ácido láctico-co-glicólico)PEGilado, un polianhidrido, poli(ortoésteres), derivados de poli(ortoésteres), poli(ortoésteres)PEGilados, poli(caprolactona), derivados de poli(caprolactona), poli(caprolactona)PEGilada, poli(ácido acrílico), derivados de poli(ácido acrílico), poli(uretano),
25 derivados de poli(uretano), o combinaciones de los mismos. Análogamente, las composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas, nanopartículas lipídicas sólidas, y similares) se pueden producir usando métodos convencionales y conjugarse con un anticuerpo de la presente descripción.

En algunos ejemplos, el anticuerpo también puede tener especificidad por uno o más antígenos además de B7-H6.
30 Por ejemplo, el anticuerpo de la invención se puede diseñar mediante ingeniería genética (por ejemplo, como diacuerpo bivalente o un dímero o trímero de Fab conjugado) para tener una especificidad de B7-H6 y otro antígeno tumoral, *por ejemplo*, un antígeno asociado con un linfoma, leucemia, melanoma, o sarcoma divulgado en el presente documento. Como alternativa, el anticuerpo se puede diseñar mediante ingeniería genética para tener una
35 especificidad por B7-H6 y un antígeno que fomenta la activación o el direccionamiento de otras células, tales como células efectoras citotóxicas o linfocitos T. Por consiguiente, la invención también incluye BiTES (encajadores de linfocitos T biespecíficos) y la descripción también proporciona DARTS (reactivos de redireccionamiento de afinidad doble).

Como se conoce en la técnica, un BiTE se refiere a una molécula de cadena monopolipeptídica que tiene dos dominios de unión a antígeno, uno de los cuales se une a un antígeno de linfocitos T (por ejemplo, CD3) y el
40 segundo de los cuales se une a un antígeno presente sobre la superficie de una célula diana (documento WO 05/061547; Baeuerle, et al. (2008) *Drugs of the Future* 33:137-147; Bargou, et al. (2008) *Science* 321:974-977). Se han construido anticuerpos BiTE contra varios antígenos diana entre los que se incluyen CD19, EpCAM, Her2/neu, EGFR, CD66e (o CEA, CEACAM5), CD33, EphA2, y MCSP (o HMW-MAA) (Baeuerle, et al. (2009) *Curr. Opin. Mol.*
45 *Ther.* 11:22-30). Los hitos clave de los anticuerpos BiTE son que, en su combinación, se distinguen de otras construcciones de anticuerpos biespecíficos, incluyen una elevada potencia para redirigir la lisis con valores de CE_{50} comprendidos entre 0,1 y 50 pmol/l (2-1.000 pg/ml) (Baeuerle, et al. (2009) *supra*); una activación de linfocitos T estrictamente dependiente de la célula diana (Brischwein, et al. (2007) *J. Immunother.* 30:798-807); y un respaldo de la lisis seriada mediante linfocitos T activados, es decir, actividad en bajas relaciones E:T. Los anticuerpos BiTE se
50 producen de forma típica como proteínas recombinantes glicosiladas secretadas por líneas de células eucariotas superiores. Por consiguiente, en otra realización de la invención, un fragmento de anticuerpo dirigido contra B7-H6 (por ejemplo, un scFv) es un componente de un BiTE. En realizaciones particulares, el BiTE de la presente invención está compuesto por un fragmento de anticuerpo dirigido contra B7-H6 y un fragmento de anticuerpo dirigido contra
55 CD3 fusionados entre sí mediante un enlazador, por ejemplo, el enlazador $(\text{G}_4\text{S})_3$. En realizaciones específicas, el fragmento de anticuerpo dirigido contra CD3 incluye una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de CDR1 de Ser-Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-Arg-Tyr-Thr-Met-His (SEQ ID NO:15), una secuencia de CDR2 de Tyr-Ile-Asn-Pro-Ser-Arg-Gly-Tyr-Thr-Asn-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Lys-Asp (SEQ ID NO:16), y una secuencia de CDR3 de Tyr-Tyr-Asp-Asp-His-Tyr-Cys-Leu (SEQ ID NO:17); y una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de CDR1 de Ser-Ala-Ser-Ser-Ser-Val-Ser-Tyr-Met-Asn (SEQ ID NO:18), una secuencia de CDR2 de Asp-Thr-Ser-Lys-Leu-Ala-Ser (SEQ ID NO:19) y una secuencia de CDR3 de Gln-Gln-Trp-Ser-Ser-Asn-Pro-Phe (SEQ ID
60 NO:20). Véase el documento US 5.929.212.

Un DART se refiere a una molécula de inmunoglobulina que incluye al menos dos cadenas polipeptídicas que están
65 asociadas (especialmente mediante una interacción covalente) para formar al menos dos sitios de unión a epítipo, que pueden reconocer el mismo epítipo, o epítopos diferentes. Cada una de las cadenas polipeptídicas de un DART incluye una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina y una región variable de la cadena pesada de

inmunoglobulina, pero estas regiones no interactúan para formar un sitio de unión a epítipo. Por el contrario, la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina de una (por ejemplo, la primera) de las cadenas polipeptídicas de DART interactúa con la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina de una cadena polipeptídica de DART diferente (por ejemplo, la segunda) para formar un sitio de unión a epítipo. Análogamente, la
 5 región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina de una (por ejemplo, la primera) de las cadenas polipeptídicas de DART interactúa con la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina de un polipéptido DART diferente (por ejemplo, el segundo) para formar un sitio de unión a epítipo. Los DART pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos, etc., siendo por tanto capaces de unirse simultáneamente a uno, dos, tres o más epítopos diferentes (que pueden ser del mismo antígeno o de antígenos diferentes). Adicionalmente, los
 10 DART pueden ser monovalentes, bivalentes, trivalentes, tetravalentes, pentavalentes, hexavalentes, etc., siendo por tanto capaces de unirse simultáneamente a uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más moléculas. Estos dos atributos de los DART (es decir, el grado de especificidad y la valencia) se pueden combinar, por ejemplo, para producir anticuerpos biespecíficos (es decir, capaces de unirse a dos epítopos) que sean tetravalentes (es decir, capaces de unirse a cuatro conjuntos de epítopos), etc. La construcción de moléculas DART se divulga en los documentos WO
 15 2006/113665, WO 2008/157379 y WO 2010/080538. Por consiguiente, en otro aspecto de la presente descripción, el fragmento del anticuerpo dirigido contra B7-H6 se incluye en un DART.

La descripción proporciona además células eucariotas o no eucariotas que se han diseñado mediante ingeniería genética recombinante para producir un anticuerpo de la descripción. Las células eucariotas o no eucariotas se
 20 pueden usar como sistema de expresión para producir el anticuerpo de la descripción. En otro ejemplo, la descripción proporciona células inmunitarias dirigidas a B7-H6 que se han diseñado mediante ingeniería genética para expresar de forma recombinante un anticuerpo específico de B7-H6 de la descripción. Por ejemplo, la descripción proporciona un linfocito T diseñado mediante ingeniería genética para expresar un anticuerpo de la descripción (por ejemplo, un scFv, scFv-Fc, (scFv)₂), que está unido a una molécula sintética con los siguientes dominios: un separador o región bisagra (por ejemplo, una bisagra de CD28 o IgG), una región transmembrana (por
 25 ejemplo, un dominio transmembrana canónico), y un dominio de señalización del receptor de linfocitos T intracelular (TCR), formando así un CAR. Los dominios de señalización intracelular TCR que se pueden incluir en un CAR incluyen, aunque no de forma limitativa, CD3zeta, los dominios de señalización de FcR-gamma y Syk-PTK así como los dominios de coseñalización de CD28, 4-1BB, y CD134. Los métodos para construir linfocitos T que expresan un
 30 CAR son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Marcu-Malina, et al. (2009) Exp. Opin. Biol. Ther. 9:579-91.

La descripción proporciona un método para inhibir células que expresan B7-H6 (células B7-H6) mediante la puesta en contacto de las células con un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión (por ejemplo, BiTE) de la descripción. El anticuerpo puede ser un anticuerpo puro (no conjugado) o un anticuerpo conjugado con una molécula
 35 sintética, por ejemplo, un agente citotóxico, citostático, o antiangiogénico o un radioisótopo. El método se puede usar para inhibir células B7-H6 *in vitro* o en un sujeto (es decir, *in vivo*). Las células B7-H6 en contacto pueden estar en, por ejemplo, un cultivo de células o en un modelo animal de un trastorno asociado con una expresión o niveles anómalos de B7-H6. El método es útil, por ejemplo, para medir y/u ordenar (con respecto a otro anticuerpo) la actividad inhibitoria del anticuerpo para un tipo de célula B7-H6 específico. La inhibición de las células B7-H6 puede
 40 incluir bloquear o reducir la actividad o el crecimiento de las células positivas para B7-H6 (es decir, células que expresan B7-H6). La inhibición también puede incluir la destrucción de las células positivas para B7-H6. La citotoxicidad de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión (por ejemplo, BiTE) de la descripción se puede evaluar usando cualquier ensayo convencional entre los que se incluyen, por ejemplo, un ensayo de citotoxicidad con de lactato deshidrogenasa tal como el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CYTOTOX 96
 45 comercialmente disponible de PROMEGA.

La descripción también proporciona un método para tratar un sujeto que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de un trastorno asociado con niveles anómalos de B7-H6. Tal como se usa en el contexto de la presente descripción, el término "anómalo" pretende incluir una expresión aumentada o disminuida de B7-H6 en comparación
 50 con la expresión de B7-H6 en células normales o sanas. A este respecto, cuando una célula normal no expresa B7-H6 y una célula B7-H6 enferma, la célula enferma muestra una expresión anómala de B7-H6. En general, el método incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo aislado, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión de la descripción al sujeto. El anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo dirigido contra B7-H6 descrito en el presente documento. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser quimérico, humanizado, sintético, F(ab)₂,
 55 Fv, scFv, F(ab')₂, F(ab), VL, VH, dsFv, Fv, o (scFv)₂. En algunos ejemplos, el método incluye administrar una IgG, un scFv, un dsFv, un F(ab')₂, un diacuerpo, un alicíclico bivalente, un CAR, un BITE o un DART. En otros ejemplos, el anticuerpo administrado se puede conjugar con una molécula sintética anteriormente descrita, por ejemplo, un agente citotóxico, citostático, o antiangiogénico o un radioisótopo terapéutico. Un agente citotóxico ilustrativo es la exotoxina A de *Pseudomonas* (PE38). Los trastornos que se pueden tratar incluyen, por ejemplo, linfomas, leucemia, melanomas, y sarcomas. Los trastornos particulares asociados con niveles elevados de B7-H6 que se pueden tratar incluyen leucemia mieloide (por ejemplo, leucemia mieloide aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, linfoma de linfocitos T o B, cáncer de cuello de útero, sarcoma gástrico, cáncer de
 60 mama, cáncer pancreático, melanoma, o cáncer de próstata.

65 La descripción también proporciona un método para tratar un sujeto que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de un trastorno asociado con niveles elevados de B7-H6 mediante transferencia adoptiva de las células

hospedadoras recombinantes, por ejemplo, los linfocitos T descritos en el presente documento, que expresan un anticuerpo de la descripción en forma de CAR o BiTE que se une de forma selectiva a B7-H6. Se puede usar tecnología recombinante para introducir material genético que codifica CAR o BiTE en cualesquiera linfocitos T adecuados, por ejemplo, linfocitos T de memoria efectores procedentes del sujeto que se va a tratar. Los linfocitos T que llevan el material genético se pueden expandir (por ejemplo, en presencia de citoquinas). Los linfocitos T recombinantes se transfieren, de forma típica mediante infusión, al paciente. Los linfocitos T de la descripción transferidos pueden desencadenar una respuesta inmunitaria a continuación contra las células que expresan B7-H6 del sujeto. El método de transferencia adoptiva se puede utilizar, por ejemplo, para tratar sujetos que tienen, o se sospecha que tienen, leucemia mieloide, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, linfoma de linfocitos T o B, cáncer de cuello de útero, sarcoma gástrico (por ejemplo, cáncer de colon), cáncer de mama, cáncer pancreático, melanoma, o cáncer de próstata.

En algunos ejemplos, los métodos de tratamiento anteriores pueden incluir además la administración simultánea de un segundo agente terapéutico para el trastorno asociado con una elevación de B7-H6. Por ejemplo, cuando el trastorno a tratar implica un cáncer que expresa B7-H6, el método puede incluir además la administración simultánea de un agente citotóxico, citostático, o antiangiogénico adecuado para el tratamiento del cáncer. Si el cáncer es un linfoma de linfocitos B, el método puede incluir además, por ejemplo, la administración simultánea de rituximab, alemtuzumab, o un régimen quimioterapéutico CHOP.

Los términos "tratar", "que trata", "tratamiento", y "terapéuticamente eficaz" usados en el presente documento no implican necesariamente un tratamiento del 100 % o un tratamiento completo. Por el contrario, existen diversos grados de tratamiento, de los cuales un experto en la materia reconoce que tiene un beneficio potencial o efecto terapéutico. A este respecto, el método de la invención puede proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento. Adicionalmente, el tratamiento proporcionado por el método de la invención puede incluir el tratamiento de una o más dolencias o síntomas de la enfermedad que se está tratando.

Para su uso en tratamiento, la descripción también proporciona una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo como se describe en el presente documento y un transportador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar a partir de cualesquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. Una composición ilustrativa incluye un anticuerpo quimérico que tiene una SEQ ID NO:3 (cadena pesada) y/o una SEQ ID NO:4 (cadena ligera). Otra composición ilustrativa incluye un anticuerpo humanizado que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR seleccionadas del grupo de la SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10. Otra composición farmacéutica ilustrativa adicional incluye un scFv dirigido contra B7-h6 fusionado con un scFv dirigido contra CD3 mediante un enlazador flexible (es decir, un BiTE). Otra composición farmacéutica ilustrativa adicional incluye un scFv dirigido contra B7-h6 fusionado con los dominios bisagra, transmembrana e intracelular de CD28 y el dominio intracelular de CD3zeta (es decir, un CAR).

La composición de la descripción puede incluir un transportador para el anticuerpo, de forma deseable, un transportador farmacéuticamente aceptable. El transportador farmacéuticamente aceptable puede ser cualquier transportador farmacéuticamente aceptable adecuado. La expresión "transportador farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, significa uno o más cargas sólidas o líquidas, diluyentes, otros excipientes, o sustancias encapsulantes, que son adecuadas para su administración a un paciente humano o veterinario (por ejemplo, un transportador fisiológicamente aceptable, o un transportador farmacológicamente aceptable). El término "transportador" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que el principio activo se combina para facilitar la aplicación. El transportador farmacéuticamente aceptable se puede mezclar simultáneamente con uno o más de los componentes activos, por ejemplo, una molécula híbrida, y entre sí, cuando más de un transportador farmacéuticamente aceptable en la composición de una forma que no altere sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada. Los materiales "farmacéuticamente aceptables" son capaces, de forma típica, de administrarse a un paciente sin producir efectos fisiológicos indeseables significativos tales como náuseas, mareos, erupción cutánea, o malestar gástrico. Es, por ejemplo, deseable que una composición que comprende un transportador farmacéuticamente aceptable no sea inmunógeno cuando se administra a un paciente humano con fines terapéuticos.

La composición farmacéutica puede contener agentes tamponadores adecuados, incluidos, por ejemplo, ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal, y ácido fosfórico en una sal. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener opcionalmente conservantes adecuados, tales como cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabenos, y timerosal.

La composición farmacéutica se puede presentar en forma de dosificación unitaria y se puede preparar por cualquier método adecuado, muchos de los cuales son bien conocidos en la técnica farmacéutica. Dichos métodos incluyen la etapa de poner el anticuerpo de la invención en asociación con un transportador que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, la composición se prepara mediante asociación de forma uniforme e íntima el principio activo con un transportador líquido, un transportador sólido finamente dividido, o ambos, y después, si fuera necesario, conformar el producto.

Una composición adecuada para la administración parenteral incluye, de forma cómoda, una preparación acuosa estéril de la composición inventiva, que es preferentemente isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación acuosa se puede formular de acuerdo con métodos conocidos usando agentes dispersantes o mojantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se incluyen agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles, como disolvente o medio de suspensión. Para este fin se puede emplear cualquier aceite fijo blando, incluidos mono o diglicéridos sintéticos. Además, se pueden usar ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables. Las formulaciones de transportadores adecuados para administración oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc. se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Los sistemas de administración útiles en el contexto de la invención incluyen sistemas de administración de liberación temporalizada, liberación retardada y liberación sostenida de forma que la administración de la composición inventiva se produce antes de, y con tiempo suficiente para producir, sensibilización del sitio a tratar. La composición de la invención se puede utilizar junto con otros agentes terapéuticos o terapias. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas de la composición de la invención, aumentando así la comodidad para el sujeto y el médico, y pueden ser particularmente adecuados para determinadas composiciones de la invención.

Muchos tipos de sistemas de administración con liberación están disponibles y son conocidos por los expertos en la materia. Los sistemas de administración con liberación incluyen sistemas de tipo polimérico tales como poli(láctido-glicólido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliésteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxi-butírico y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen en, por ejemplo, el documento US 5.075.109. Los sistemas de suministro también incluyen sistemas no poliméricos que son lípidos que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; revestimientos de cera; comprimidos fabricados por compresión utilizando aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fundidos; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, aunque no de forma limitativa: sistemas erosionables en los cuales la composición activa está contenida en una forma comprendida en una matriz tal como se describe en los documentos US 4.452.775, US 4.667.014, US 4.748.034 y US 5.239.660; y sistemas difusionales en los que un componente activo permea a una velocidad controlada desde un polímero tal como se describe en los documentos US 3.832.253 y US 3.854.480. Además, se pueden utilizar sistemas de administración mediante bomba, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.

El término "sujeto" se usa en el presente documento, por ejemplo, respecto a los métodos terapéuticos y de diagnóstico, para referirse a sujetos humanos o animales. Los sujetos animales incluyen, aunque no de forma limitativa, modelos animales, tales como, modelos de dolencias o trastornos en mamíferos asociadas con una expresión elevada de B7-H6 tal como leucemia mieloide, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, linfoma de linfocitos T o B, cáncer de cuello de útero, sarcoma gástrico (por ejemplo, cáncer de colon), cáncer de mama, cáncer pancreático, melanoma, o cáncer de próstata.

En otro ejemplo, la descripción proporciona el uso de los anticuerpos de la descripción para detectar, en una muestra de ensayo, una cantidad alterada de B7-H6 (por ejemplo, B7-H6 en la superficie celular), por ejemplo, con respecto a un control. Una muestra de ensayo puede proceder de un cultivo de células o de un sujeto experimental, *por ejemplo*, plasma o una muestra de tejido de un sujeto que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de una enfermedad o dolencia asociados con una expresión anómala de B7-H6 en un sujeto. Una cantidad de control corresponde deseablemente a la cantidad de B7-H6 detectada usando el mismo anticuerpo en una muestra(s) procedente de uno o más cultivos o sujetos del control. Los métodos para usar el anticuerpo de la descripción para determinar las cantidades de B7-H6 pueden incluir cualquier inmunoensayo tal como la inmunotransferencia (western), el enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), y la citometría de flujo, por ejemplo, análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

Adicionalmente, se puede usar la detección de B7-H6 para controlar el progreso de un trastorno asociado con la expresión de B7-H6. Las cantidades de B7-H6 que están significativamente elevadas o disminuidas con respecto al control indican que el trastorno del sujeto está deteriorándose o mejorando, respectivamente.

Se pueden utilizar los cribados anteriores para identificar la presencia o controlar el progreso de trastornos incluyendo, por ejemplo, leucemia mieloide, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, linfoma de linfocitos T o B, cáncer de cuello de útero, sarcoma gástrico (por ejemplo, cáncer de colon), cáncer de mama, cáncer pancreático, melanoma, o cáncer de próstata.

La descripción proporciona también kits adecuados para llevar a cabo los métodos de la descripción. Por lo general, un kit incluye dos o más componentes necesarios para llevar a cabo un método terapéutico o de detección de la descripción. Los componentes del kit incluyen, aunque no de forma limitativa, uno o más anticuerpos de la descripción, reactivos adecuados, y/o equipo.

Un kit puede incluir un anticuerpo de la descripción y un tampón de inmunoensayo adecuado para detectar B7-H6 (por ejemplo, mediante ELISA o FACS). El kit puede contener también una o más placas de microvaloración, patrones, diluyentes de ensayo, tampones de lavado, cubiertas de placas adhesivas, y/o instrucciones para llevar a cabo un método de la descripción usando el kit. El kit puede incluir un anticuerpo de la descripción unido a un sustrato, (por ejemplo, una placa multipocillos o un chip), que se envasa de forma adecuada y es útil para detectar B7-H6. En algunos ejemplos, el kit incluye un anticuerpo de la descripción que se conjuga a una etiqueta, tal como, una etiqueta fluorescente, una etiqueta enzimática biológicamente activa, una etiqueta luminiscente, o una etiqueta de cromóforo. El kit puede incluir además reactivos para visualizar el anticuerpo conjugado, por ejemplo, un sustrato para la enzima. En algunos ejemplos, el kit incluye un anticuerpo de la descripción que se conjuga con un agente de contraste y, opcionalmente, uno o más reactivos o elementos del equipo útiles para la obtención de imágenes del anticuerpo en un sujetao.

Generalmente, el anticuerpo de la descripción en un kit se envasa de forma adecuada, por ejemplo, en un vial, bolsa, ampolla, y/o cualquier recipiente adecuado para un método terapéutico o de detección. Se pueden proporcionar los componentes del kit como concentrados (incluyendo composiciones liofilizadas), que se pueden diluir además antes del uso o se pueden proporcionar a la concentración de uso. Cuando el anticuerpo de la descripción se utiliza para el uso *in vivo*, se pueden proporcionar dosificaciones individuales en recipientes esterilizados que tienen la cantidad deseada y la concentración de los agentes.

La invención se describe en mayor detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Materiales y Métodos

Construcción de un receptor de antígeno quimérico dirigido contra B7H6. Se construyó CAR dirigido contra B7H6 fusionando un fragmento variable con un único cambio (scFv) del clon 47.39 del hibridoma dirigido contra B7H6 a dominios bisagra-transmembrana-citoplásmicos de CD28 humana (restos 135-220) y el dominio citoplásmico de CD3 zeta (restos 52-164). Se llevó a cabo la construcción del scFv dirigido contra B7H6 fusionando la región variable de la cadena pesada (V_H) y las cadenas ligeras (V_L) con un enlazador de 15 aminoácidos glicina (G)-serina (S) ((enlazador de G_4S)₃; 3 repeticiones de GGGGS (SEQ ID NO:14)). A continuación se clonó la construcción dirigida contra B7H6 en un vector retroviral pFB-neo (Stratagene, Palo Alto, CA). Se preparó la construcción T2A-tCD19 dirigida contra B7H6 fusionando CAR dirigido contra B7H6 con una secuencia T2A, seguido por CD19 humana truncada (restos 1-327). Todas las PCR se realizaron utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (New England Biolabs, Ipswich, MA).

Transducción retroviral. Se llevó a cabo la transducción de linfocitos T primarios de murino usando virus ecotrópicos recogidos de células GP+E86 transducidas con vectores, mientras que los virus retrovirales duotrópicos generados a partir de células PT67 transducidas con vectores se usaron para infectar linfocitos T primarios humanos. Los linfocitos T primarios procedentes de bazo de ratones B6 se infectaron 18~24 horas después de la estimulación con concanavalina A (ConA, 1 µg/ml). Dos días después de la inyección, los linfocitos T primarios transducidos ($0,5 \times 10^6$ /ml) se seleccionaron en medio RPMI-10 que contenía G418 (1 mg/ml) más 25 U/ml de rHuIL-2 durante 3 días más. Se aislaron células viables usando HISTOPAQUE-1083 (Sigma, St. Louise, MO), se lavaron extensamente, y se expandieron durante 2 días sin G418 antes de los análisis funcionales o la inyección intravenosa. Los linfocitos T humanos primarios procedentes de clones de células se activaron con el mAb OKT3 dirigido contra CD3 (40 ng/ml; eBioscience) más IL-2 (50 U/ml) durante 3 días antes de la transducción. La selección de G418 y la expansión de linfocitos T se llevaron a cabo siguiendo procedimientos similares para el cultivo de linfocitos T de ratón.

Construcción de una BiTE dirigida contra B7H6. El scFv dirigido contra B7H6 se fusionó mediante un enlazador flexible a un scFv dirigido contra OKT3, es decir, scFv dirigido contra CD3; Arakawa, et al. (1996) J. Biochem. 120:657-62; US 5.929.212,

(Figura 6A). La proteína BiTE humana resultante (huBiTE) se expresó en células PT67 empaquetadas transfectadas de forma estable en un vector retroviral. A continuación se cultivaron las células resultantes en medio exento de suero. Se recogieron los sobrenadantes y se evaluó la citotoxicidad en células tumorales de BiTE anti-B7H6 usando un ensayo convencional de lactato deshidrogenasa (Figura 6B). Este análisis mostró que BiTE anti-B7H6 podría lisar específicamente las células tumorales B7H6⁺.

Para determinar si BiTE anti-B7H6 podría encajar tanto los linfocitos T como las células tumorales y conducir a la activación de los linfocitos T, los linfocitos T activados por OKT3 se cultivaron simultáneamente con células tumorales (RMA, RMA-B7H6, y K562) con o sin BiTE anti-B7H6 durante 24 horas. Se analizaron cantidades de IFN-γ en sobrenadantes con ELISA. Este análisis indicó que la BiTE dirigida contra B7H6 indujo la secreción de IFN-γ en el medio de los linfocitos T cultivados simultáneamente con células tumorales que expresaban B7H6, es decir, RMA-B7H6, y K562 (Figuras 7A y 7B). Análogamente, BiTE de ratón anti-B7H6 (MuBiTE1) se añadió a un cultivo simultáneo de esplenocitos activados por ConA y células tumorales y muestra estimular la secreción sólida de IFN-γ en los linfocitos T y el sistema de cultivo simultáneo de células tumorales (Figura 7C). Además, al igual que huBiTE, los linfocitos T activados específicamente por muBiTE destruyen las células tumorales B7H6⁺ (Figuras 8A y 8B).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Trustees of Dartmouth College Sentman, Charles L. Zhang, Tong
- 5 <120> ANTICUERPO DIRIGIDO CONTRA B7-H6, PROTEÍNAS DE FUSIÓN, Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS
- <130> DC0509WO
- 10 <150> US 61/643.456
- <151> 07/05/2012
- <150> US 61/705.227
- <151> 25/09/2012
- 15 <160> 20
- <170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1
- <211> 1418
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
- <223> Secuencia de la cadena pesada sintética
- <400> 1

```

atggaatgga cctgggtcct tctctcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcccag      60
gttcagctgc agcagtctgg agctgagctg atgaagcctg gggcctcagt gaagctttcc      120
tgcaaggcta ctggctacac attcactggc tactggatag agtggataaa gcagaggcct      180
ggacatggcc ttgagtggat tggagagatt ttacctgga ctggtagtac taactacaat      240
gagaagttca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg      300
caactcagca gcctgacaac tgaggactct gccatctatt actgtgcaat cccggggcct      360
atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct cagccaaaac aacagcccca      420
tcggctctatc cactggcccc tgtgtgtgga ggtacaactg gctcctcggg gactctagga      480
tgctgtgtca agggttattt ccctgagcca gtgaccttga cctggaactc tggatccctg      540
tccagtggtg tgcacacctt cccagctctc ctgcagtctg gcctctacac cctcagcagc      600
tcagtgactg taacctcgaa cacctggccc agccagacca tcacctgaa tgtggcccac      660
ccggcaagca gcaccaaagt ggacaagaaa attgagccca gagtgcccat aacacagaac      720
ccctgtcctc cactcaaaga gtgtccccc tgcgcagctc cagacctctt ggggtggacca      780
tccgtcttca tcttccctcc aaagatcaag gatgtactca tgatctccct gagccccatg      840
gtcacatgtg tgggtggtgga tgtgagcgag gatgaccag acgtccagat cagctggttt      900
gtgaacaacg tgaagtaca cacagctcag acacaaacc atagagagga ttacaacagt      960
actctccggg tggtcagtgc cctccccatc cagcaccagg actggatgag tggcaaggag     1020

```

ES 2 719 495 T3

ttcaaagca aggtcaacaa cagagccctc ccatcccca tcgagaaaac catctcaaaa 1080
cccagagggc cagtaagagc tccacaggta tatgtcttgc ctccaccagc agaagagatg 1140
actaagaaaag agttcagtct gacctgcatg atcacaggct tcttacctgc cgaaattgct 1200
gtggactgga ccagcaatgg gcgtacagag caaaactaca agaacaccgc aacagtcctg 1260
gactctgatg gttcttactt catgtacagc aagctcagag tacaaaagag cacttgggaa 1320
agaggaagtc ttttcgcctg ctcaagtggc cacgagggc tgacacaatca ccttacgact 1380
aagaccatct cccggactcc gggtaaatga gcggccgc 1418

5 <210> 2
<211> 719
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia de la cadena ligera sintética
<400> 2

atggacatga ggaccctgc tcagtttctt ggaatcttgt tgctctgggt tccaggtatc 60
aatgtgaca tcaagatgac ccagtctcca tcttccatgt atgcatctct aggagagaga 120
gtcactatca cttgcaaggc gagtcaggac attaatagct atttaagctg gttccagcag 180
aaaccagggg aatctcctaa gaccctgatc tatcgtgcaa acagattggt agatggggtc 240
ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg caagattatt ctctcaccat cagcagcctg 300
gagtatgaag atatgggaat ttattattgt ctacagtatg atgagtttcc gtacacgttc 360
ggagggggga ccaagctgga aataaaacgg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtgagcagtt aacatctgga ggtgcctcag tcgtgtgctt cttgaacaac 480
ttctaccca aagacatcaa tgtcaagtgg aagattgatg gcagtgaacg acaaaatggc 540
gtcctgaaca gttggactga tcaggacagc aaagacagca cctacagcat gagcagcacc 600
ctcacgttga ccaaggacga gtatgaacga cataacagct atacctgtga ggccactcac 660
aagacatcaa cttcaccat tgtcaagagc ttcaacagga atgagtgtta ggcgccgc 719

15 <210> 3
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia de la cadena pesada sintética
<400> 3

ES 2 719 495 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Cys
 35 40 45

Asp Arg Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Ser Thr Asn Tyr Asn
 50 55 60

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 65 70 75 80

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile
 85 90 95

Tyr Cys Asp Arg Tyr Cys Ala Ile Pro Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 4
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de la cadena ligera sintética

<400> 4

5

10

ES 2 719 495 T3

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Cys
 35 40 45

Asp Arg Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60

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

Leu Glu Tyr Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu
 85 90 95

Phe Cys Asp Arg Cys Asp Arg Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 100 105 110

Leu Glu Ile Lys
 115

5 <210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de CDR1 sintética
 <400> 5

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Trp
 1 5

15 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de CDR2 sintética
 <400> 6

Ile Leu Pro Gly Thr Gly Ser Thr
 1 5

25 <210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

ES 2 719 495 T3

<220>
<223> Región variable de la cadena pesada de CDR3 sintética

<400> 7

5

Ala Ile Pro Gly Pro Met Asp Tyr
1 5

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Región variable de la cadena ligera de CDR1 sintética

15

<400> 8

Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
1 5

<210> 9
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Región variable de la cadena ligera de CDR2 sintética

25

<400> 9

Arg Ala Asn
1

30

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Región variable de la cadena ligera de CDR3 sintética

40

<400> 10

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 11
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Dominio citoplásmico de CD3 sintético

50

<400> 11

ES 2 719 495 T3

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 50 55 60
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 65 70 75 80
 Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 85 90 95
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 100 105 110

Arg

- <210> 12
- <211> 86
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Dominios bisagra-transmembrana-citoplásmico de CD28 sintéticos
- <400> 12

ES 2 719 495 T3

Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser
 1 5 10 15

Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr
 20 25 30

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys
 35 40 45

Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg
 50 55 60

Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp
 65 70 75 80

Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 85

<210> 13
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CD19 sintética

<400> 13

Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met
 1 5 10 15

Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp
 20 25 30

Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln
 35 40 45

5

10

ES 2 719 495 T3

Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu
50 55 60

Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ser
65 70 75 80

Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu
85 90 95

Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr
100 105 110

Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp
115 120 125

Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro
130 135 140

Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala
145 150 155 160

Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Val Pro Pro
165 170 175

Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro
180 185 190

Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser
195 200 205

Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser
210 215 220

Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp
225 230 235 240

Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala
245 250 255

Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu
260 265 270

Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly
275 280 285

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

ES 2 719 495 T3

Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg
 305 310 315 320

Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr
 325

5 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido enlazador sintético
 <400> 14

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

15 <210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR1 HCVR de CD3
 <400> 15

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His
 1 5 10

25 <210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> CDR2 HCVR de CD3
 <400> 16

Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

40 <210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> CDR3 HCVR de CD3
 <400> 17

ES 2 719 495 T3

Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu
1 5

5 <210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CDR1 HCVR de CD3 sintético
<400> 18

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
1 5 10

15 <210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> CDR2 HCVR de CD3 sintético
<400> 19

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

25
30 <210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> CDR3 HCVR de CD3 sintético
<400> 20

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe
1 5

40

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de antígeno quimérico que comprende:
 - 5 (a) un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a B7, homólogo 6,
(b) una región transmembrana, y
(c) un dominio de señalización del receptor de linfocitos T intracelular.
2. El receptor de antígeno quimérico de la reivindicación 1, en el que
 - 10 (i) la región transmembrana y el dominio de señalización del receptor de linfocitos T intracelular proceden de CD3 zeta; y/o
(ii) el receptor de antígeno quimérico comprende además (a) un dominio transmembrana o un dominio de señalización intracelular de un receptor de proteína coestimuladora, o (b) una región bisagra o región de separación para proporcionar flexibilidad o una mayor separación intercelular.
3. El receptor de antígeno quimérico de la reivindicación 1 o 2, en el que el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que se une específicamente a B7, homólogo 6 comprende:
 - 20 (a) una región variable de la cadena pesada que comprende,
 - (i) una CDR1 de la SEQ ID NO: 5,
 - (ii) una CDR2 de la SEQ ID NO: 6, y
 - 25 (iii) una CDR3 de la SEQ ID NO: 7; y
 - (b) una región variable de la cadena ligera que comprende,
 - (i) una CDR1 de la SEQ ID NO: 8,
 - (ii) una CDR2 de la SEQ ID NO: 9, y
 - 30 (iii) una CDR3 de la SEQ ID NO: 10.
4. Un linfocito T recombinante que comprende el receptor de antígeno quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 35 5. Un encajador de linfocitos T biespecífico que comprende:
 - (a) un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a B7, homólogo 6, y
 - (ii) un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno de linfocitos T.
- 40 6. El encajador de linfocitos T biespecífico de la reivindicación 5, en el que el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que se une específicamente a B7, homólogo 6 comprende:
 - (a) una región variable de la cadena pesada que comprende,
 - 45 (i) una CDR1 de la SEQ ID NO: 5,
 - (ii) una CDR2 de la SEQ ID NO: 6, y
 - (iii) una CDR3 de la SEQ ID NO: 7; y
 - (b) una región variable de la cadena ligera que comprende,
 - 50 (i) una CDR1 de la SEQ ID NO: 8,
 - (ii) una CDR2 de la SEQ ID NO: 9, y
 - (iii) una CDR3 de la SEQ ID NO: 10.
- 55 7. El encajador de linfocitos T biespecífico de la reivindicación 5 o 6, en el que
 - (i) el dominio de unión a antígeno comprende un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a CD3; y/o
 - (ii) el fragmento de anticuerpo que se une específicamente a CD3 comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende
 - 60 (a) (i) una CDR1 de la SEQ ID NO: 15, (a) (ii) una CDR2 de la SEQ ID NO: 16, y (a) (iii) una CDR3 de la SEQ ID NO: 17; y
 - (b) una región variable de la cadena ligera que comprende, (b) (i) una CDR1 de la SEQ ID NO: 18, (b) (ii) una CDR2 de la SEQ ID NO: 19, y (b)(iii) una CDR3 de la SEQ ID NO:20.
- 65 8. Una composición farmacéutica que comprende el receptor de antígeno quimérico de una cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 3 o el encajador de linfocitos T biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 y un transportador farmacéuticamente aceptable.

5 9. El receptor de antígeno quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el encajador de linfocitos T biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para su uso como medicamento.

10 10. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del receptor de antígeno quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el encajador de linfocitos T biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para su uso en la destrucción o inhibición del crecimiento de células que expresan B7 homólogo 6 en un sujeto.

15 11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del receptor de antígeno quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el encajador de linfocitos T biespecíficos de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o dolencia asociada con una expresión elevada de B7 homólogo 6.

12. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 u 11, en la que

20 (i) la enfermedad o dolencia es leucemia mieloide, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, linfoma de linfocitos T, linfoma de linfocitos B, cáncer de cuello de útero, sarcoma gástrico, cáncer de mama, cáncer pancreático, melanoma, o cáncer de próstata; y/o

(ii) la composición farmacéutica comprende además un segundo agente terapéutico.

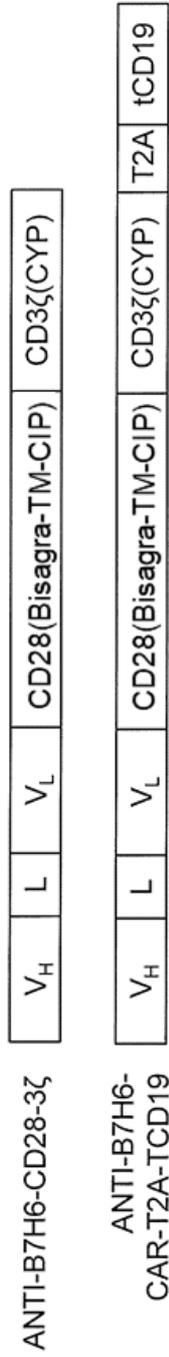


FIG. 1

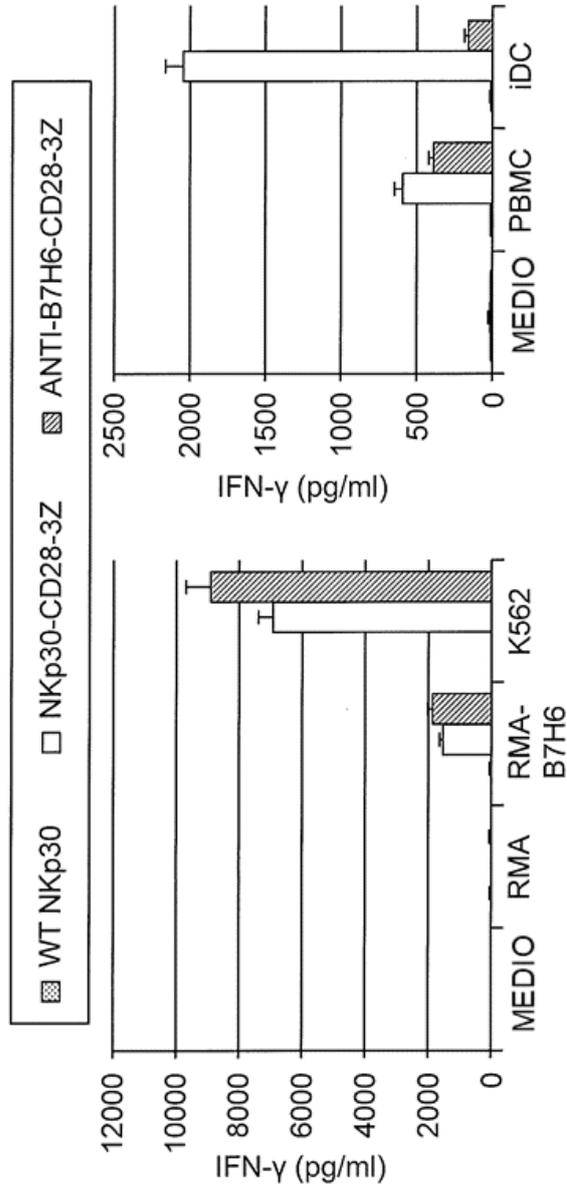


FIG. 2A

FIG. 2B

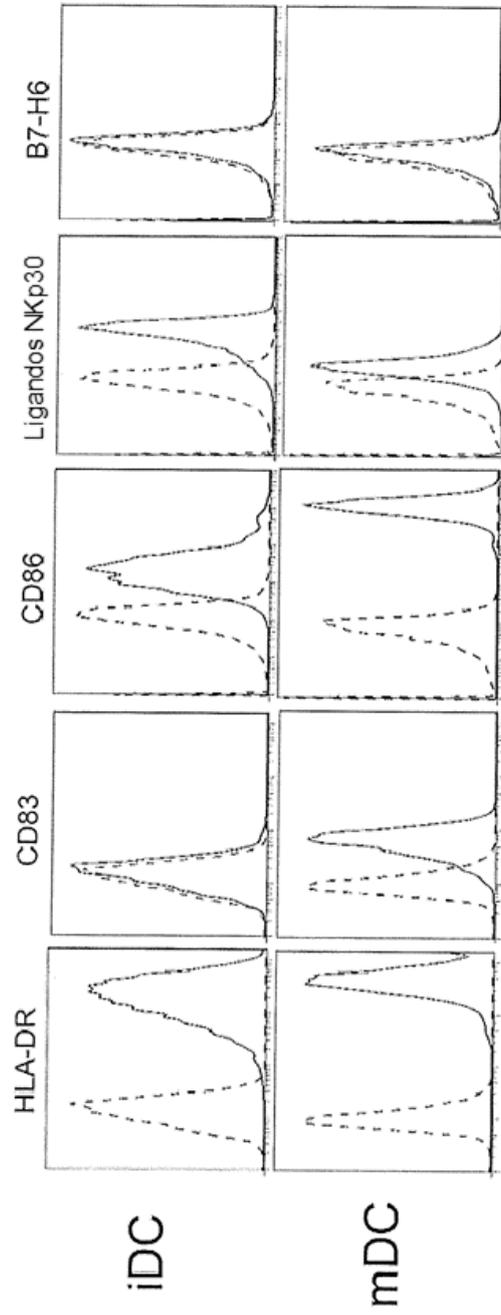


FIG. 3

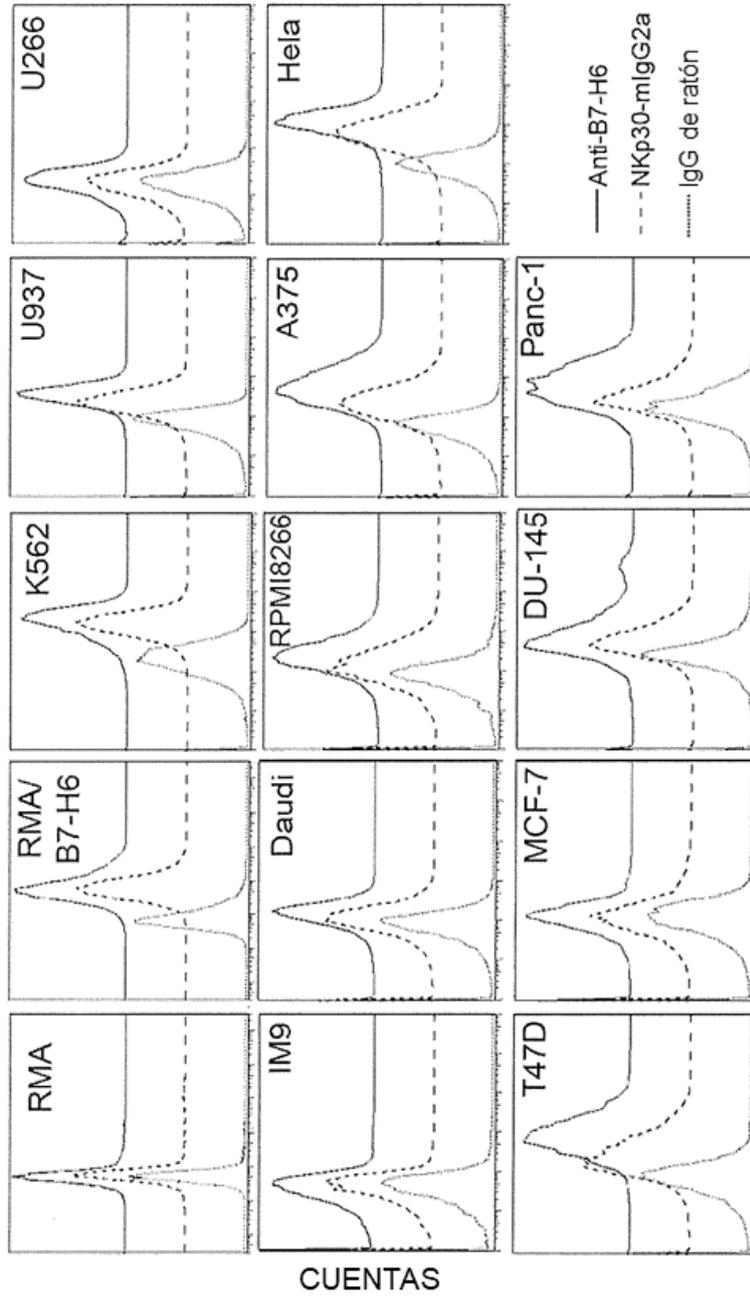


FIG. 4

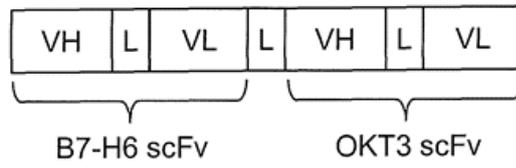


FIG. 6A

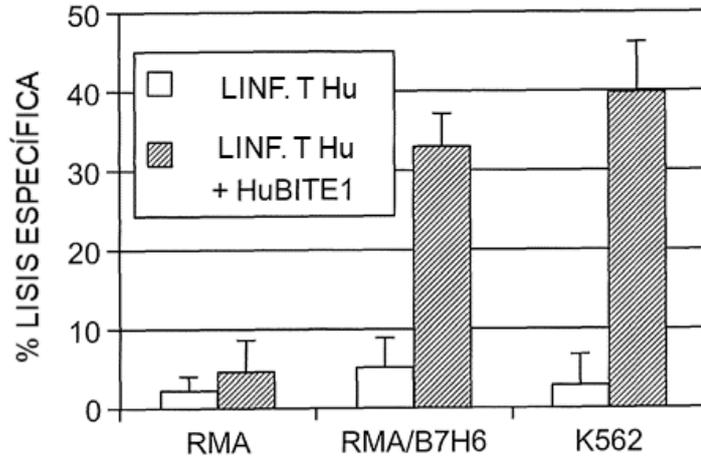


FIG. 6B

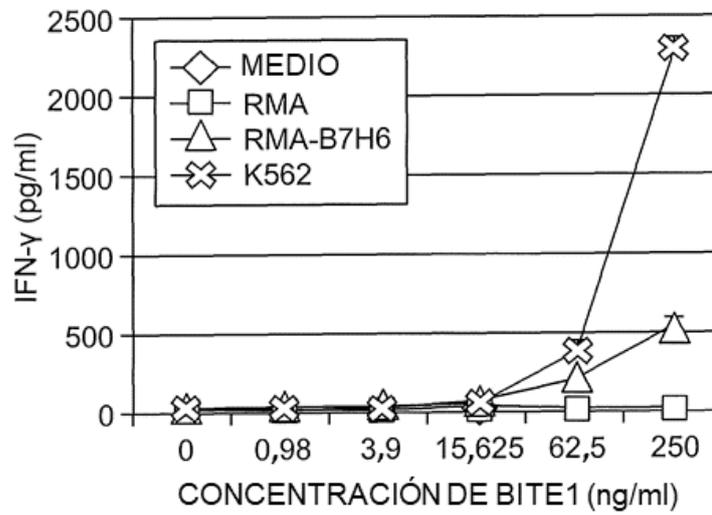


FIG. 7A

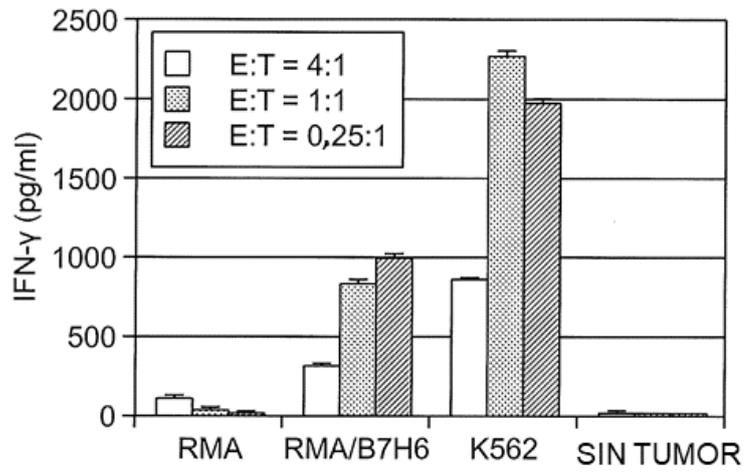


FIG. 7B

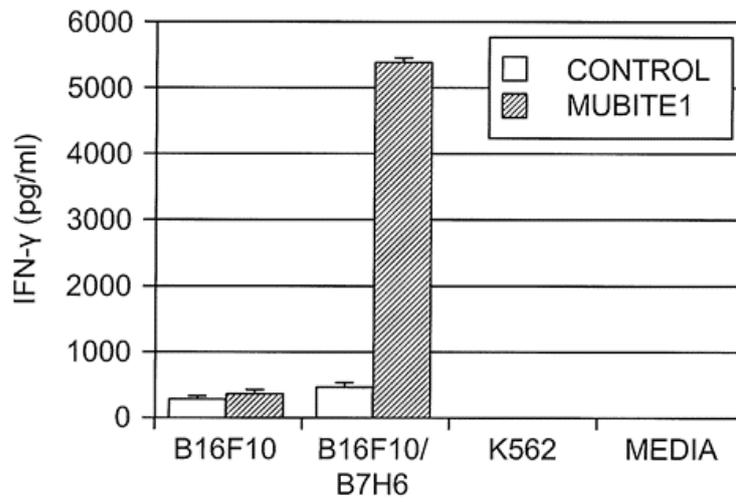


FIG. 7C

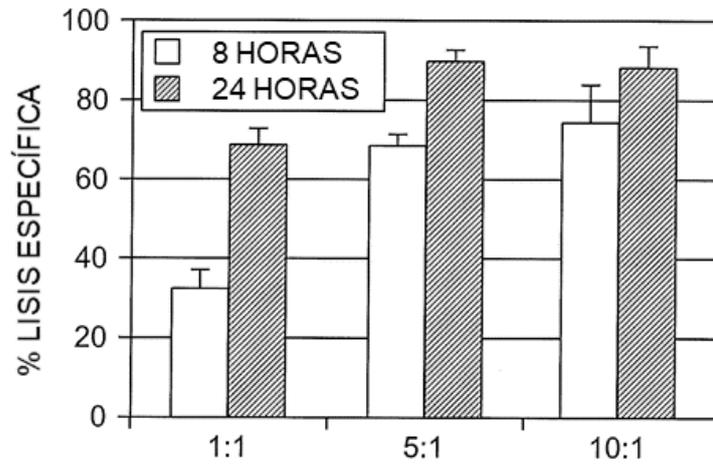


FIG. 8A

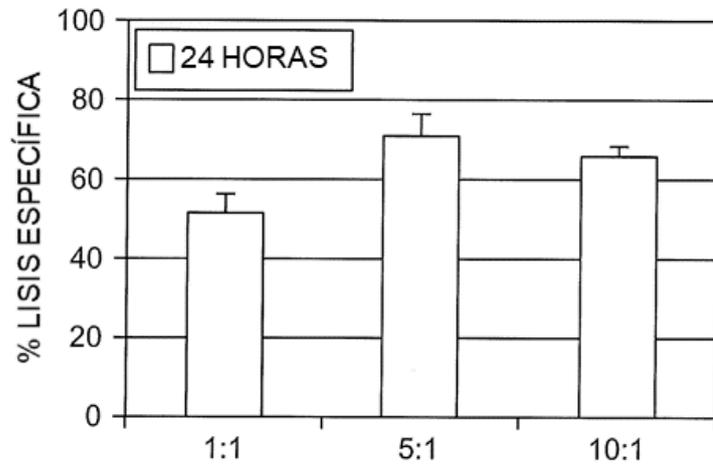


FIG. 8B