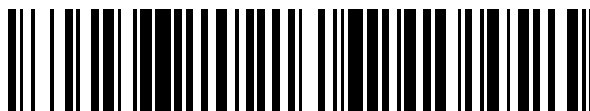


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 743**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12N 5/078** (2010.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2011 PCT/EP2011/004490**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2012 WO12031744**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2011 E 11755014 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2614077**

54 Título: **Receptores de antígenos quiméricos con una región bisagra optimizada**

30 Prioridad:

**08.09.2010 EP 10009345**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.02.2017**

73 Titular/es:

**CHEMOTHERAPEUTISCHES  
FORSCHUNGSINSTITUT GEORG-SPEYER-HAUS  
(100.0%)  
Paul-Ehrlich-Strasse 42-44  
60596 Frankfurt, DE**

72 Inventor/es:

**SCHÖNFELD, KURT;  
KNOPP, CHRISTIANE y  
WELS, WINFRIED**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 602 743 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

Receptores de antígenos quiméricos con una región bisagra optimizada

La presente invención se refiere a proteínas multifuncionales que comprenden (i) un péptido, señal, (ii) un dominio de reconocimiento específico de diana, (iii) una región enlazadora, que conecta el dominio (ii) y el dominio (iv) que comprende una región bisagra modificada específicamente de la cadena alfa de CD8 humana, y (iv) un dominio efector. La presente invención se refiere además a ácidos nucleicos que codifican las proteínas, construcciones de expresión para expresar la proteína en una célula huésped y células huésped. Las proteínas de la invención son receptores de antígenos quiméricos con una región enlazadora o de bisagra optimizada que son adecuados para generar células efectoras específicas de diana, para su uso como medicamento, en particular en el tratamiento del cáncer y en inmunoterapia adoptiva específica de célula diana.

**Antecedentes de la invención**

Los linfocitos T reconocen antígenos específicos a través de la interacción del receptor de linfocitos T (TCR) con péptidos cortos presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I o II. Para la activación inicial y expansión clonal, los linfocitos T vírgenes son dependientes de células presentadoras de antígeno (APC, *Antigen-Presenting Cells*) profesionales que proporcionan señales coestimuladoras adicionales. La activación del TCR en ausencia de coestimulación puede provocar insensibilidad y anergia clonal. Para esquivar la inmunización, se han desarrollado diferentes enfoques para la derivación de células efectoras citotóxicas con especificidad de reconocimiento injertada. Se han construido receptores de antígenos quiméricos (CAR, *Chimeric Antigen Receptors*) que consisten en dominios de unión derivados de ligandos naturales o anticuerpos específicos para antígenos de superficie celular, generalmente fusionados a moléculas efectoras tales como las cadenas alfa y beta de TCR, o componentes del complejo CD3 asociado a TCR. Tras la unión al antígeno, dichos receptores de antígenos quiméricos se unen a rutas de señalización endógenas en la célula efectora y generan señales de activación similares a las iniciadas por el complejo TCR. Desde los primeros informes sobre receptores de antígenos quiméricos, este concepto se ha refinado constantemente y se ha optimizado el diseño molecular de los receptores quiméricos (para una revisión, véase Uherek y col., 2001). Ayudados por los avances en la tecnología de anticuerpos recombinantes, se han generado receptores de antígenos quiméricos dirigidos a una amplia diversidad de antígenos sobre la superficie de células cancerosas y de células infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (para una revisión, véase Uherek y col., 2001).

El documento US 2007/0031438 A1 describe un CAR que comprende un dominio de unión de un anticuerpo contra el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), una bisagra de CD8 modificada en que al menos uno de los restos de cisteína se ha mutado y un dominio de señalización zeta del receptor de linfocitos T. En particular, el documento US 2007/0031438 A1 usa una región bisagra de CD8 humana con las posiciones de los aminoácidos 135 a 180 (de acuerdo con la numeración de aminoácidos de Swissprot P01732), en la que la cisteína en la posición 164 está sustituida con alanina.

Fitzer-Attas y col. (1998) describe un CAR que comprende una región bisagra de CD8 no modificada con las posiciones de los aminoácidos 116 a 208 (de acuerdo con la numeración de Swissprot P01732), que comprende tres restos de cisteína en las posiciones 164, 181 y 206. El receptor quimérico además usa dominios quinasa como dominio efector.

El documento WO 2008/045437 A2 describe CAR que comprenden como parte de unión extracelular, una parte de anticuerpo de cadena sencilla que se une a EGFRvIII, una parte transmembrana derivada de la cadena alfa de CD8 humana o CD28, y una parte de señalización intracelular derivada de CD3 zeta humana. En particular, el documento WO 2008/045437 A2 describe proteínas del receptor de linfocitos T quiméricas con una región bisagra de CD8 modificada con las posiciones de los aminoácidos 135 a 205, 135 a 203 o 135 a 182 (de acuerdo con la numeración de aminoácidos de Swissprot P01732), comprendiendo cada una restos de cisteína en las posiciones 164 y 181.

El documento WO 95/30014 A1 describe un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede obtener de un anticuerpo monoclonal dirigido contra un antígeno adecuado sobre una célula tumoral (tal como scFv(FRP5)), una región bisagra que comprende de 40 a 200 aminoácidos y una cadena zeta funcional que se puede obtener del receptor de antígenos de linfocitos T. En particular, el CAR del documento WO 95/30014 A1 usa la región bisagra de CD8 murina no modificada con las posiciones de los aminoácidos 132 a 191 (de acuerdo con la numeración de aminoácidos de Swissprot P01731), que comprende un resto de cisteína en la posición 178.

El documento US 2008/0260738 A1 describe proteínas de fusión de anticuerpo que comprenden al menos dos monómeros Fc y al menos un enlazador, en el que se usa una región bisagra de CD8 modificada para unir los dos monómeros Fc. En particular, el documento US 2008/0260738 A1 usa regiones de bisagra de CD8 modificadas con las posiciones de los aminoácidos 131 a 170 o 136 a 169 (de acuerdo con la numeración de aminoácidos de Swissprot P01732), en las que la cisteína en la posición 164 está sustituida con serina.

Nolan y col. (1999) describe receptores de linfocitos T de inmunoglobulina, quiméricos (IgTCR) con una especificidad por el antígeno carcinoembrionario (CEA) que se crearon para evaluar las estructuras IgTCR adecuadas para terapia contra el cáncer. Los autores combinaron dominios de unión a antígeno de un anticuerpo

humanizado combinado con cadenas de señalización de TCR para producir cuatro IgTCR quiméricos diferentes: el fragmento Fv de cadena sencilla (sFv)-zeta, el fragmento de unión a antígeno (Fab)-zeta, sFv-épsilon y Fab-épsilon. Para la construcción scFV-zeta los autores introdujeron 46 aminoácidos de la bisagra CD8 $\alpha$  entre la cadena scFv y TCR-zeta para añadir un espaciador adicional entre el resto de unión a antígeno y la superficie de la membrana.

5 La presente invención está dirigida a proporcionar receptores de antígenos quiméricos optimizados que permitan una expresión superficial más eficaz y una alta funcionalidad en linfocitos.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar medios y procedimientos para generar células efectoras específicas de antígeno, así como medios y procedimientos para el uso en inmunoterapia adoptiva específica de célula diana y para el tratamiento del cáncer.

10 **Sumario de la invención**

La presente invención resuelve los objetivos reivindicados en las reivindicaciones.

De acuerdo con la presente invención, este objetivo se resuelve por una proteína multifuncional o de múltiples dominios que comprende

15 (i) un péptido señal;  
 (ii) un dominio de reconocimiento específico de diana;  
 (iii) una región enlazadora, que conecta el dominio (ii) y el dominio (iv); en la que la región enlazadora no contiene uno o más restos de cisteína y se selecciona de cualquiera de los siguientes:

20 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2,  
 una secuencia de aminoácidos con al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 2 con la condición de que el resto de aminoácidos 48 no sea una cisteína y sea una serina, y  
 una secuencia de aminoácidos que difiere en uno, dos o tres restos de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2 con la condición de que el resto de aminoácido 48 no sea una cisteína y sea una serina; y

25 (iv) un dominio efector que comprende una región transmembrana y uno o más dominios de señalización intracelular,

en la que el dominio efector (iv) comprende o es una fusión del dominio transmembrana e intracelular de CD28 humana con el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana.

De acuerdo con la presente invención, este objetivo se resuelve, además por el ácido nucleico que codifica la proteína multifuncional.

30 De acuerdo con la presente invención, este objetivo se resuelve, además, por una construcción de expresión para expresar la proteína multifuncional.

De acuerdo con la presente invención, este objetivo se resuelve, además, por una célula huésped que expresa la proteína multifuncional o que comprende el ácido nucleico o la construcción de expresión, que se selecciona de células efectoras del sistema inmunitario, y en la que las células efectoras del sistema  
 35 inmunitario son células asesinas naturales (NK), linfocitos T asesinos naturales (NKT) o una preparación de linfocitos que contienen células NK y células NKT.

De acuerdo con la presente invención, este objetivo se resuelve, además, usando la proteína multifuncional, el ácido nucleico o la construcción de expresión para generar células efectoras específicas de antígeno.

40 De acuerdo con la presente invención, este objetivo se resuelve además, por la proteína multifuncional, el ácido nucleico, la construcción de expresión o la célula huésped para su uso como un medicamento.

De acuerdo con la presente invención, este objetivo se resuelve, además, por la proteína multifuncional, el ácido nucleico, la construcción de expresión o la célula huésped para su uso en el tratamiento del cáncer.

45 De acuerdo con la presente invención, este objetivo se resuelve, además, por la proteína multifuncional, el ácido nucleico, la construcción de expresión o la célula huésped para su uso en inmunoterapia adoptiva específica de célula diana.

**Descripción de las realizaciones preferidas de la invención**

50 Antes de describir la presente invención en mayor detalle a continuación, debe entenderse que la presente invención no está limitada a la metodología particular, protocolos y reactivos descritos en el presente documento ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones particulares solamente, y no se pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitada solamente por las reivindicaciones adjuntas. Salvo que se defina de otro modo, todos los términos

técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que los comprendidos habitualmente por un experto en la materia. Para el propósito de la presente invención, todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan por referencia en sus totalidades.

*Proteínas multifuncionales, de múltiples dominios*

5 Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona proteínas multifuncionales que comprenden varios dominios, concretamente

- (i) un péptido señal;
- (ii) un dominio de reconocimiento específico de diana;
- (iii) una región enlazadora específica, que conecta el dominio (ii) y el dominio (iv); y
- 10 (iv) un dominio efector específico.

Las proteínas multifuncionales de la invención son receptores de antígenos quiméricos caracterizados por una región bisagra optimizada (región enlazadora).

15 Las proteínas de la invención son preferentemente proteínas receptoras de superficie celular y, por tanto, comprenden una parte extracelular (dominios (i) y (ii) y (iii)), una parte transmembrana (a la que contribuye/compuesta del dominio (iv)) y una parte citoplasmática (a la que contribuye/comprendida en el dominio (iv) y puede insertarse, por tanto, en la membrana plasmática de la célula huésped. La funcionalidad de las proteínas de la invención dentro de una célula huésped es detectable en un ensayo adecuado para demostrar el potencial de señalización de dicha proteína tras la unión de un ligando particular. Dichos ensayos están disponibles para los expertos en la materia.

20 Tras la unión a la diana, dichos receptores de antígenos quiméricos se unen a rutas de señalización endógenas en una célula (una célula efectora) y generan ciertas señales activadoras (dependiendo del dominio efector).

25 La expresión de los receptores de antígenos quiméricos (CAR) con especificidad definida de diana (tal como especificidad de célula diana) en linfocitos y otras células efectoras del sistema inmunitario (tales como linfocitos T o células asesinas naturales (NK)) produce variantes genéticamente modificadas de dichas células que abordan selectivamente y eliminan dianas definidas, incluyendo, aunque sin limitación, células malignas que portan un antígeno superficial respectivo asociado a tumor o células infectadas por virus que portan un antígeno superficial específico de virus o células diana que portan un antígeno superficial específico de linaje o específico de tejido. Por tanto, dicha expresión de CAR genera células efectoras específicas de antígeno para el uso en inmunoterapia adoptiva específica de célula diana. Los CAR están compuestos de un dominio de reconocimiento específico de diana o dominio de reconocimiento celular (dominio (ii), tal como un fragmento de anticuerpo scFv) para el reconocimiento de una diana (tal como un antígeno de superficie de célula tumoral) fusionado mediante una región de enlazador flexible a un dominio efector (que comprende una región transmembrana y uno o más dominios de señalización intracelular como la cadena zeta del complejo CD3 del receptor de linfocitos T). La expresión de CAR vuelve a dirigir la actividad citotóxica de las células efectoras (linfocitos) a las dianas (células tumorales) y desencadena su citólisis por las células efectoras inmunitarias que expresan CAR. De ese modo, la unión del dominio de reconocimiento específico de diana del CAR a su diana afín sobre la superficie de las células diana/virus transmite una señal a las células efectoras inmunitarias que expresan CAR mediante el dominio o dominios de señalización intracelular del CAR que activa la actividad citotóxica endógena de dichas células efectoras inmunitarias.

40 *(i) El péptido señal*

Un "péptido señal" se refiere a una secuencia peptídica que dirige el transporte y localización de la proteína dentro de una célula, por ejemplo, a un cierto orgánulo celular (tal como retículo endoplasmático) y/o la superficie celular.

45 El *péptido señal (i)* es un péptido señal de cualquier proteína humana secretada o transmembrana de tipo I (extremo N-terminal extracelular), que permite el transporte de la proteína multifuncional de la invención a la membrana celular y la superficie celular y permite la correcta localización de la proteína multifuncional de la invención, en particular la parte extracelular (dominios (i) y (ii) y (iii)) sobre la superficie celular; la parte transmembrana (a la que contribuye/comprendida en el dominio (iv)) insertada en la membrana plasmática y la parte citoplasmática (en la que contribuye/comprendida en el dominio (iv)) en la célula huésped.

50 Preferentemente, el péptido señal se escinde después de pasar al retículo endoplasmático (ER), es decir, es un péptido señal escindible.

En una realización, el péptido señal (i) comprende o es un péptido señal de cadena pesada de inmunoglobulina.

*(ii) El dominio de reconocimiento específico de diana*

El dominio de reconocimiento específico de diana (ii) se une a un antígeno, receptor, ligando peptídico o ligando proteico de la diana.

El dominio de reconocimiento específico de diana (ii) preferentemente comprende

- un dominio de unión antígeno derivado de un anticuerpo contra un antígeno de la diana, o
- un péptido que se une a un antígeno de la diana, o
- un péptido o proteína que se une a un anticuerpo que se une a un antígeno de la diana, o
- 5 - un ligando peptídico o proteico (incluyendo, aunque sin limitación, un factor de crecimiento, una citoquina o una hormona) que se une a un receptor en la diana, o
- un dominio derivado de un receptor (incluyendo, aunque sin limitación, un receptor de factor de crecimiento, un receptor de citoquina o un receptor de hormona) que se une a un ligando peptídico o proteico en la diana.

Preferentemente, la diana es una célula o un virus.

- 10 El dominio de reconocimiento específico de diana sirve para dirigir la proteína multifuncional o una célula respectiva que expresa/porta la proteína multifuncional sobre su superficie a una diana específica. La unión del dominio de reconocimiento específico de diana de la proteína multifuncional (CAR) con su diana afín sobre la superficie de células diana/virus además transmite una señal en las células efectoras inmunitarias que expresan la proteína multifuncional (CAR) mediante el dominio o dominios de señalización intracelular de la proteína multifuncional que activa la actividad citotóxica endógena de dichas células efectoras inmunitarias.
- 15

Preferentemente, el antígeno de la diana es

- un antígeno superficial asociado a tumor  
incluyendo, aunque sin limitación ErbB2 (HER2/neu), antígeno carcinoembrionario (CEA), molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), variante III de EGFR (EGFRvIII), CD19, CD20, CD30, CD40, disialogangliósido GD2, una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que presente un epítipo peptídico específico de tumor, o
- 20 - un antígeno tisular específico de linaje o específico de tejido  
incluyendo, aunque sin limitación, CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD33, CD34, CD133, CD138, CTLA-4, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), endoglina, una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC),
- 25 o
- un antígeno superficial específico de virus,  
incluyendo, aunque sin limitación, un antígeno específico de VIH (tal como gp120 de VIH), un antígeno específico de EBV, un antígeno específico de CMV, un antígeno específico de HPV, un antígeno específico de HBV, un antígeno específico de HCV, un antígeno específico del virus de Lassa, un antígeno específico del virus de la gripe.
- 30

En una realización, cuando el dominio (ii) se obtiene de un dominio de unión a antígeno, el dominio de unión a antígeno se obtiene preferentemente de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), un fragmento Fab, un diacuerpo, un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo o cadena ligera de anticuerpo.

- 35 En una realización de la invención el antígeno de la diana es el antígeno superficial asociado a tumor ErbB2 y el dominio de unión a antígeno del dominio (ii) es de un scFv específico para ErbB2.

*(iii) La región enlazadora*

La región enlazadora (iii) conecta el dominio de reconocimiento específico de diana (ii) y el dominio efector (iv).

- 40 La región enlazadora sirve como espaciador flexible entre el dominio de reconocimiento específico de diana (ii) y el dominio efector (iv). Asegura la accesibilidad necesaria y flexibilidad del dominio de reconocimiento específico de diana (ii). Se entiende que la región enlazadora es esencial para la funcionalidad de las proteínas multifuncionales de la invención.

- 45 Las construcciones CAR actuales contienen una región enlazadora derivada de la cadena alfa de la molécula CD8 murina o humana que proporciona una conexión flexible entre dominios de direccionamiento celular y de señalización/efectores (Uherek y col., 2002; Müller y col., 2008). Sin embargo, una o más cisteínas desapareadas presentes en la región enlazadora de la cadena alfa de CD8 puede provocar enlaces covalentes intra o intermoleculares indeseados de moléculas CAR que afectan negativamente a la expresión superficial de CAR así como la funcionalidad de CAR.

- 50 El asunto de la invención es la generación de construcciones CAR optimizadas que no formen dichos enlaces covalentes no productivos mediante el resto de cisteína desapareado de la cadena alfa de CD8 humana y que faciliten una expresión superficial eficaz y alta funcionalidad en linfocitos.

- 55 Esto se consigue, de acuerdo con la invención, empleando un fragmento específico de la región bisagra derivada de la cadena alfa de CD8 humana que varía de las posiciones de aminoácido 117 a 178 (numeración de acuerdo con la secuencia de la cadena alfa de la glucoproteína CD8 de superficie de linfocitos T humanos; número de acceso Swiss-Prot P01732), y modificando la secuencia de aminoácidos de la región bisagra derivada de la cadena alfa de CD8 humana, en particular reemplazando/convirtiendo la cisteína o cisteínas desapareadas en restos de serina o

delecionando la cisteína o cisteínas desapareadas. La construcción CAR optimizada resultante se expresa a niveles mayores en la superficie celular y media una potente eliminación específica de antígeno. En comparación con células que portan un CAR actual, las células que portan la construcción CAR optimizada contienen un nivel inferior de dominio efector endógeno desapareado (tal como cadena zeta de CD3) pero niveles mayores de complejos receptores funcionales y dímeros productivos entre CAR y el dominio efector endógeno (tal como la cadena zeta de CD3)

En particular, la región enlazadora (iii) comprende una región bisagra modificada de la cadena alfa de CD8 humana.

La secuencia de la cadena alfa de la glucoproteína CD8 de superficie de linfocitos T humanos (número de acceso Swiss-Prot P01732 (CD8A\_HUMANA)) [SEQ ID NO. 13]

```

      10      20      30      40      50      60
MALPVTALLL PLALLLHAAR PSQFRVSPLD RTWNLGETVE LKCQVLLSNP TSGCSWLFQP
      70      80      90     100     110     120
RGAASPTFL  LYLSQNKPKA  AEGLDTQRF  GKRLGDTFVL  TLSDFRRENE  GYFCSALSN
      130     140     150     160     170     180
SIMYFSHFVP VFLPAKPTTT PPRPPTPAP TIASQPLSLR PEACRPAAGG AVHTRGLDFA
      190     200     210     220     230
CDIYIWAPLA GTCGVLLLSL VITLYCNHRN RRRVCKCPRP VVKSGDKPSL SARYV
    
```

En la que la región bisagra flexible son los aminoácidos 117 a 178 [SEQ ID NO. 1]:  
 ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD

La modificación de la región bisagra de la cadena alfa de CD8 humana de acuerdo con la invención es el remplazo del resto o restos de cisteína con uno o más restos de serina o la delección del resto o restos de cisteína.

De acuerdo con la invención, la región enlazadora (iii) consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2:  
 ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLD

o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2, con la condición de que el resto de aminoácido n.º 48 de la SEQ ID NO. 2 no sea una cisteína y sea una serina y con la condición de que la secuencia de aminoácidos no contenga ningún resto de cisteína,

o una secuencia de aminoácidos que difiere en uno, dos o tres restos de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2, con la condición de que el resto de aminoácido n.º 48 de la SEQ ID NO. 2 no sea una cisteína y sea una serina y con la condición de la secuencia de aminoácidos no contenga ningún resto de cisteína, en la que "difiere" se refiere al remplazo/sustitución, adición o delección, tal como una o más sustituciones conservativas de los restos de aminoácido.

Por tanto, la región enlazadora (iii) no contiene ningún resto de cisteína.

Por tanto, la región enlazadora (iii) se selecciona de cualquiera de los siguientes:

- la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2,
- una secuencia de aminoácidos con al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 2 con la condición de que el resto de aminoácido 48 no sea una cisteína y sea una serina,
- y
- una secuencia de aminoácidos que difiere en uno, dos o tres restos de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2 con la condición de que el resto de aminoácido 48 no sea una cisteína y sea una serina.

Como se ha analizado anteriormente, la técnica anterior describe receptores de antígenos quiméricos que contienen como regiones enlazadoras diferentes fragmentos de la región bisagra derivada de la cadena alfa de CD8 humana o murina. Sin embargo, la región bisagra modificada específica de la invención que se usa como región enlazadora (iii) en las proteínas multifuncionales de acuerdo con la invención no se ha usado o divulgado en la técnica y se ha descubierto por los inventores que es particularmente ventajosa para la expresión de las proteínas multifuncionales/CAR de acuerdo con la invención y su transporte a la superficie de las células efectoras (como se ha demostrado en esta memoria descriptiva, por ejemplo, en las Figuras 3 y 4). Además, la región bisagra modificada específica de la invención provoca una funcionalidad mejorada de las proteínas multifuncionales/CAR de acuerdo con la invención (como se ha demostrado en esta memoria descriptiva, por ejemplo en las Figuras 4 y 5). Esta expresión y funcionalidad mejoradas de los CAR de acuerdo con la invención se debe a la selección y modificación específica de los restos de aminoácido 117 a 178 de la cadena alfa de CD8 humana como región

enlazadora (iii) en las proteínas multifuncionales. La región bisagra modificada específica de la invención que se usa como región enlazadora (iii) en las proteínas multifuncionales de acuerdo con la invención evita la aparición de cisteínas desapareadas no incluyendo las cisteínas presentes de forma natural en las posiciones de aminoácido 115 y 181 de la cadena alfa de CD8 humana, y el remplazo de resto de cisteína presente de forma natural en la posición de aminoácido 164 de la cadena alfa de CD8 humana con un resto de serina químicamente similar. Además, la longitud de 62 restos de aminoácido de la región bisagra modificada específica de la invención que se usa como región enlazadora (iii) en las proteínas multifuncionales de acuerdo con la invención asegura una distancia espacial óptima del dominio de reconocimiento específico de diana (ii) unido de forma N-terminal desde el dominio efector transmembrana e intracelular (iv) unido de forma C-terminal, proporcionando alta flexibilidad y eficacia del reconocimiento de la célula diana. En contraste, la técnica anterior describe CAR que emplean como regiones enlazadoras fragmentos no modificados de la región bisagra de la cadena alfa de CD8 humana (véase, por ejemplo, Fitzer-Atlas y col. 1998, documento WO 2008/045437) o la cadena alfa de CD8 murina (véase, por ejemplo, el documento WO 95/30014) que contiene cisteínas de origen natural de la cadena alfa de CD8, que puede afectar negativamente a la expresión y funcionalidad de estos CAR a través de la formación de enlaces disulfuro intra o intermoleculares indeseados. Además, la técnica anterior describe CAR que emplean como regiones enlazadoras fragmentos modificados de la región bisagra de la cadena alfa de CD8 humana que abarca secuencias significativamente más cortas de aminoácidos (tales como de solamente aproximadamente 30 a aproximadamente 40 restos de aminoácido, véase, por ejemplo, el documento US 2007/0031438), que reduce la distancia espacial del dominio de reconocimiento específico de diana desde el dominio efector y puede afectar negativamente a la flexibilidad y eficacia del reconocimiento de la célula diana.

(iv) *El domino efector*

El dominio efector (iv) comprende una región transmembrana y uno o más dominios de señalización intracelular.

El acoplamiento del reconocimiento de la diana/antígeno a la maquinaria de señalización intracelular. La unión del dominio de reconocimiento específico de diana (ii) de la proteína multifuncional (CAR) a su diana afín sobre la superficie de células diana/virus además transmite una señal a las células efectoras inmunitarias que expresan la proteína multifuncional (CAR) mediante el dominio o dominios de señalización intracelular de la proteína multifuncional (que son parte del dominio efector) que activa la actividad citotóxica endógena de dichas células efectoras inmunitarias.

**De acuerdo con la invención**, el dominio efector (iv) comprende o consiste en (es)

(b) una fusión del dominio transmembrana e intracelular de CD28 humana con el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana.

La expresión "equivalente funcional" define una proteína o secuencia de nucleótidos, que tiene una secuencia diferente de aminoácidos o bases, en comparación con las secuencias divulgadas en el presente documento, pero que muestran la misma función *in vitro* e *in vivo*. Un ejemplo de un equivalente funcional es un gen modificado o sintético, que codifica la expresión de una proteína idéntica o altamente homóloga a la codificada por el gen o secuencia de tipo silvestre divulgada en el presente documento.

La presente invención también describe:

La secuencia de la cadena zeta de la glucoproteína CD3 de superficie de linfocitos T humanos (número de acceso Swiss-Prot P20963 (CD3Z\_HUMANA); Isoforma 3) [SEQ ID NO. 3]

```

      10          20          30          40          50          60
MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD
      70          80          90         100         110         120
APAYQQGQNQ LYNELNLGRR EEYDVLDKRR GRDPEMGGKP RRKNPQEGLY NELQDKMAE
      130         140         150         160
AYSEIGMKGE RRRGKGDHGL YQGLSTATKD TYDALHMQAL PPR

```

Por ejemplo, un dominio efector puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO. 3 o uno o más fragmentos de la misma (tal como el dominio transmembrana e intracelular de la cadena zeta de CD3 humana, tal como los restos de aminoácido 29 a 163 de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO. 3) o un equivalente funcional de la misma, en la que un "equivalente funcional" tiene menor identidad de secuencia (tal como al menos un 80 % de identidad de secuencia, tal como al menos un 90 % de identidad de secuencia, tal como al menos un 95 % de identidad de secuencia o un 99 % de identidad de secuencia) pero es una cadena zeta funcional del complejo CD3 del receptor de linfocitos T.

De acuerdo con la invención, la cadena zeta es de origen humano. Dentro del TCR la cadena zeta de CD3 existe como homodímero disulfuro. Una "cadena zeta de CD3 funcional" o "una cadena zeta funcional del complejo CD3 del receptor de linfocitos T" es una proteína que tras la expresión en hibridomas de linfocitos T deficientes en la expresión de zeta endógena es capaz de restaurar en dichos hibridomas un TCR funcionalmente activo.

5 De acuerdo con la invención, la fusión de un fragmento del receptor CD28 coestimulador fusionado a un fragmento de la cadena zeta del complejo CD3 del receptor de linfocitos T contiene:

- (b1) el dominio transmembrana de CD28 humana;
- (b2) el dominio intracelular de CD28 humana; y
- (b3) el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana;

10 La secuencia de la glucoproteína CD28 de superficie específica de linfocitos T humanos (número de acceso Swiss-Prot P10747 (CD28\_HUMANA)) [SEQ ID NO. 4]

```

      10          20          30          40          50          60
MLRLLLALNL  FPSIQVTGNK  ILVKQSPMLV  AYDNAVNLSC  KYSYNLFSRE  FRASLHKGLD

      70          80          90         100         110         120
SAVEVCVVYG  NYSQQLQVYS  KTGFNC DGKL  GNE SVTFYLQ  NLYVNQTDIY  FCKIEVMYPP

     130         140         150         160         170         180
PYLDNEKSNQ  TIIHVKGKHL  CPSPLFPGPS  KPFWVLVVVG  GVLACYSLLV  TVAFIIFWVR

     190         200         210         220
SKRSRLLHSD  YMNMTPRRPG  PTRKHYQPYA  PPRDFAAYRS
    
```

15 en la que (b1) es preferentemente los restos de aminoácido 151-180 de la SEQ ID NO. 4, (b2) es los restos de aminoácido 181-220 de la SEQ ID NO. 4 y (b3) es los restos de aminoácido 52-163 de la SEQ ID NO. 3 (= SEQ ID NO. 5):

```

KPFWVLVVVG  GVLACYSLLV  TVAFIIFWVR  SKRSRLLHSD  YMNMTPRRPG  PTRKHYQPYA
PPRDFAAYRS  RVKFSRSADA  PAYQQGQNQL  YNELNLGRRE  EYDVLDKRRG  RDPENGGKPR
RKNPQEGLYN  ELQKDKMAEA  YSEIGMKGER  RRGKGDGLY  QGLSTATKDT  YDALHMQUALP  PR
    
```

20 El dominio efector (iv) comprende o consiste en (es) una secuencia de aminoácidos con la secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO. 5 o un equivalente funcional de la misma, en la que un "equivalente funcional" tiene menor identidad de secuencia (tal como al menos un 80 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia o un 99 % de identidad de secuencia) pero es una fusión funcional de un receptor CD28 coestimulador fusionado a un fragmento de la cadena zeta del complejo CD3 del receptor de linfocitos T.

25 Preferentemente, la proteína multifuncional de acuerdo con la invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de un péptido señal (escindible) (i), un scFv (ii), la región bisagra modificada (iii) (como se define en el presente documento, preferentemente de la SEQ ID NO. 2) y la fusión del dominio transmembrana e intracelular de CD28 humana con el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana (iv) (en la que el péptido señal esta en el extremo N-terminal y la cadena zeta/fusión está en el extremo C-terminal).

30 La invención describe también una proteína que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 6.

La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 6 se refiere a la secuencia de aminoácidos de una proteína multifuncional con los dominios:

- (i) [péptido señal] - (ii) [scFv anti-*ErbB2*] - (iii) [**bisagra modificada**] - (iv) [dominio transmembrana e intracelular de la cadena zeta de CD3 humana]



MDWIWRILFLVGAATGAHSQVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTNYGMNWVKQAPGQ  
 GLKWMGWINTSTGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLSKSEDSATYFCARWEVYHGY  
 VPYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSHKFLSTSVGDRVSITCKASQDVYNAV  
 AWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGSGSPDFTFTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTF  
 FTFGSGTKLEIK**ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRP**

**AAGGAVHTRGLD**PKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG  
 RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL  
YQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

En una realización preferida, la proteína de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 7;

- 5 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 7 (con la condición de que el resto de aminoácido n.º 308 (es decir, el resto de aminoácido n.º 48 de la región bisagra modificada (SEQ ID NO. 2)) no sea una cisteína y sea una serina y con la condición de que la secuencia de aminoácidos de la región bisagra modificada (es decir, los restos de aminoácido n.º 261 a 322) no contenga ningún resto de cisteína.

- 10 La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 7 se refiere a la secuencia de aminoácidos de la proteína multifuncional con los dominios:

(i) [péptido señal] - (ii) [scFv anti-*ErbB2*] - (iii) [**bisagra modificada**] - (iv) [fusión del dominio transmembrana e intracelular de CD28 humana con el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana]

MDWIWRILFLVGAATGAHSQVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTNYGMNWVKQAPGQ  
 GLKWMGWINTSTGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLSKSEDSATYFCARWEVYHGY  
 VPYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSHKFLSTSVGDRVSITCKASQDVYNAV  
 AWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGSGSPDFTFTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTF  
 FTFGSGTKLEIK**ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRP**  
**AAGGAVHTRGLD**KPFWVLVVGGVLAACYLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPG  
PTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD  
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL  
HMQUALPPR

- 15 En líneas generales, un experto en la materia es consciente del hecho de que algunos intercambios de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de una proteína o péptido no tiene ninguna influencia sobre la estructura (secundaria o terciaria), la función y la actividad de la proteína o péptido (en absoluto). Las secuencias de aminoácidos con dichos intercambios "neutros" de aminoácidos en comparación con las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento están dentro del alcance de la presente invención.

20 *Ácidos nucleicos, construcciones de expresión y células huésped*

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona ácidos nucleicos/moléculas de ácido nucleico/moléculas aisladas de ácido nucleico que codifican las proteínas de la invención.

- 25 Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención comprenden ADN (tal como ADNbc, ADNmc, ADNc), ARN (tal como ARNbc, ARNmc, ARNm), combinaciones de los mismos o derivados (tales como PNA) de los mismos.

Preferentemente, un ácido nucleico de la invención comprende

- el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2;
- o
- la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO. 8 (= secuencia de nucleótidos que codifica la región bisagra modificada)

- 30 o sus secuencias complementarias;  
 o secuencias que tienen al menos un 95 % de identidad de secuencia, o un 99 % de identidad de secuencia con las secuencias anteriores (con la condición de que el resto de aminoácido n.º 48 de la SEQ ID NO. 2 no sea una cisteína y sea una serina y con la condición de que la región bisagra modificada no contenga ningún resto de cisteína).

35 Preferentemente, un ácido nucleico de la invención comprende además

- el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 5;  
o
- la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO. 10 (= secuencia de nucleótidos que codifica la fusión del dominio transmembrana e intracelular de CD28 humana con el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana),  
o sus secuencias complementarias;  
o secuencias que tienen al menos un 95 % de identidad de secuencia o un 99 % de identidad de secuencia con las secuencias anteriores,

preferentemente fusionadas al ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2 o la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO. 8  
o a sus secuencias complementarias;  
o a secuencias que tienen al menos un 95 % de identidad de secuencia o un 99 % de identidad de secuencia con las secuencias anteriores SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 8 (con la condición de que el resto de aminoácido n.º 48 de la SEQ ID NO. 2 no sea una cisteína y sea una serina y con la condición de que la región bisagra modificada no contenga ningún resto de cisteína).

Preferentemente, un ácido nucleico de la invención comprende o consiste en

- el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 7;  
o
- la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO. 12 (= secuencia de nucleótidos que codifica la proteína multifuncional con los dominios (i) [péptido señal] - (ii) [scFv anti-ErbB2] - (iii) [bisagra modificada] - (iv) [fusión del dominio transmembrana e intracelular de CD28 humana con el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana]);

o sus secuencias complementarias;

o secuencias que tienen al menos un 95 % de identidad de secuencia, o un 99 % de identidad de secuencia con las secuencias anteriores (con la condición de que el resto de aminoácido n.º 48 de la SEQ ID NO. 2 no sea una cisteína y sea una serina y con la condición de que la secuencia de aminoácidos de la región bisagra modificada (es decir, los restos de aminoácido n.º 261 a 322) no contenga ningún resto de cisteína).

Preferentemente, las secuencias de ácidos nucleico de la presente invención están optimizadas en los codones para la expresión en células de mamífero, preferentemente para la expresión en células humanas. La optimización de codones se refiere al intercambio en una secuencia de interés de codones que generalmente son infrecuentes en genes muy expresados de una especie dada por codones que son generalmente frecuentes en genes muy expresados de dicha especie, codificando dichos codones los mismos aminoácidos que los codones que se están intercambiando.

Dentro del alcance de la presente invención están las secuencias de nucleótidos obtenidas debido a la degeneración del código genético de las secuencias anteriores de nucleótidos.

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona construcciones de expresión para expresar la proteína de la invención en una célula.

Preferentemente, las construcciones de expresión comprenden adicionalmente secuencias promotoras y terminadoras.

Una "construcción de expresión o génica" (en la que ambos términos se usan de forma intercambiable durante toda esta memoria descriptiva) se refiere a una construcción de ácido nucleico, habitualmente un vector de expresión o plásmido que se usa para introducir una secuencia génica específica en una célula diana. Una vez la construcción de expresión o génica está dentro de la célula, la proteína que está codificada por el gen se produce por la maquinaria celular de transcripción y traducción. La construcción de expresión o génica está diseñada para contener secuencias reguladoras respectivas que actúan como regiones potenciadoras y promotoras y conducen a una transcripción eficaz del gen portado en la construcción, incluyendo secuencias promotoras y terminadoras. El objetivo de una construcción de expresión o génica bien diseñada es la producción de grandes cantidades de ARNm estable, y por lo tanto proteínas.

Los expertos en la materia pueden seleccionar componentes adecuados adicionales de construcciones de expresión o génicas.

Los ácidos nucleicos y/o en particular construcciones de expresión de la invención son capaces de dirigir la síntesis/expresión de la proteína multifuncional de la invención en una célula huésped adecuada.

Los ácidos nucleicos y/o construcciones de expresión de la invención son ADNbc, ADNmc, ARN o ARNm o combinaciones de los mismos.

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona células huésped que expresan una proteína de la invención o que comprenden un ácido nucleico o una construcción de expresión de la invención.

5 De acuerdo con la invención, la célula huésped se selecciona de células efectoras del sistema inmunitario, y en la que las células efectoras del sistema inmunitario son células asesinas naturales (NK), linfocitos T asesinos naturales (NKT) o una preparación de linfocitos que contiene células NK y células NKT.

"Células efectoras" del sistema inmunitario o "células efectoras inmunitarias" se refiere a células de origen hematopoyético incluyendo, aunque sin limitación, los tipos celulares mencionados anteriormente que están funcionalmente implicados en el inicio y/o ejecución de respuestas inmunitarias innatas y/o adaptativas.

*Usos de las proteínas, ácidos nucleicos, construcciones de expresión y células huésped*

10 Como se ha descrito anteriormente, la invención proporciona el uso de la proteína multifuncional, ácido nucleico o construcción de expresión para generar células efectoras específicas de antígeno.

15 "Células efectoras específicas de antígeno" o "células efectoras específicas de diana" se refieren a células efectoras del sistema inmunitario o células efectoras inmunitarias genéticamente modificadas para expresar la proteína multifuncional de la invención por transferencia de una construcción de expresión o ácido nucleico que codifica dicha proteína multifuncional. Dichas células efectoras específicas de antígeno o específicas de diana son medios versátiles, en particular en el tratamiento de enfermedades (como se describe a continuación para ACT y tratamiento del cáncer).

Como se ha descrito anteriormente, la invención proporciona la proteína multifuncional, ácido nucleico, construcción de expresión o célula huésped para su uso como medicamento.

20 Como se ha descrito anteriormente, la invención proporciona la proteína multifuncional, ácido nucleico, construcción de expresión o célula huésped para su uso en el tratamiento del cáncer.

Como se ha descrito anteriormente, la invención proporciona la proteína multifuncional, ácido nucleico, construcción de expresión o célula huésped para su uso en inmunoterapia adoptiva específica de célula diana.

25 "Inmunoterapia adoptiva específica de célula diana" se refiere a una forma de terapia en que se transfieren células inmunitarias a huéspedes que albergan tumor. Las células inmunitarias tienen una reactividad antitumoral y pueden mediar efectos antitumorales directos o indirectos.

30 "Inmunoterapia adoptiva específica de célula diana" o "terapia celular adoptiva (ACT)" es un tratamiento que usa células efectoras inmunitarias, tales como linfocitos con actividad antitumoral, expandidas *in vitro* e infundidas en el paciente con cáncer. Ha surgido ACT usando linfocitos de infiltración tumoral autólogos como el tratamiento más eficaz para pacientes con melanoma metastásico y puede mediar la regresión objetiva del cáncer en aproximadamente el 50 % de los pacientes. El uso de linfocitos donantes para ACT es un tratamiento eficaz para pacientes inmunosuprimidos que desarrollan linfomas postrasplante (revisado en Rosenberg y col., 2008). Sin embargo, la capacidad de diseñar genéticamente linfocitos humanos y usarlos para mediar la regresión del cáncer en paciente, que se ha demostrado recientemente (véase, Morgan y col., 2006), ha abierto posibilidades para la ampliación de la inmunoterapia ACT a pacientes con una amplia diversidad de tipos de cáncer y es un nuevo enfoque prometedor para el tratamiento del cáncer. Por tanto, la ingeniería genética de linfocitos con receptores de antígenos quiméricos (CAR), tales como los proporcionados por la presente invención, es muy adecuado, para ACT y abre más posibilidades en el tratamiento del cáncer. Especialmente, como los estudios han demostrado claramente que la administración de linfocitos T antitumorales muy ávidos dirigidos contra una diana adecuada pueden mediar la regresión de cánceres grandes, vascularizados y metastásicos en seres humanos y proporcionan principios de guía, así como estímulos para el desarrollo adicional de inmunoterapia para el tratamiento de pacientes con cáncer.

*Procedimientos de tratamiento*

Además, la invención divulga procedimientos para generar células efectoras específicas de antígeno.

45 El procedimiento para generar células efectoras específicas de antígeno puede comprender

- (a) proporcionar una proteína multifuncional, ácido nucleico o construcción de expresión de acuerdo con la invención;
- (b) proporcionar una célula huésped o línea celular, que se selecciona de células efectoras del sistema inmunitario, tales como linfocitos incluyendo, aunque sin limitación, linfocitos citotóxicos, linfocitos T, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T auxiliares, linfocitos T Th17, células asesinas naturales (NK), linfocitos T asesinos naturales (NKT), mastocitos, células dendríticas, células dendríticas citolíticas, linfocitos B;
- (c) transferir la proteína multifuncional, ácido nucleico o construcción de expresión proporcionado en la etapa (a) a la célula huésped o línea celular proporcionada en la etapa (b);
- (d) selección opcional de las células transgénicas (modificadas con el gen).

La presente invención también divulga procedimientos para el tratamiento de enfermedades, en particular del cáncer, y procedimientos de inmunoterapia, incluyendo inmunoterapia adoptiva específica de célula diana.

El procedimiento para el tratamiento de enfermedades, en particular del cáncer, puede comprender administrar a un sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz

- 5 a) una proteína multifuncional, un ácido nucleico, una construcción de expresión o una célula huésped (en particular una célula efectora específica de antígeno) obtenida y definida en el presente documento, y (b) opcionalmente, uno o más excipientes respectivos.

El procedimiento de inmunoterapia, preferentemente incluyendo o utilizando inmunoterapia adoptiva específica de célula diana, puede comprender

10 administrar a un sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz

- a) una proteína multifuncional, un ácido nucleico, una construcción de expresión o una célula huésped (en particular una célula efectora específica de antígeno) obtenida y definida en el presente documento, y (b) opcionalmente, uno o más excipientes respectivos.

15 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de proteína multifuncional, un ácido nucleico, una construcción de expresión o una célula huésped (en particular una célula efectora específica de antígeno) de la presente invención se refiere a la cantidad que es suficiente para tratar la enfermedad respectiva o para conseguir el resultado respectivo de la inmunoterapia adoptiva específica de célula diana.

*Secuencias:*

20 La SEQ ID NO. 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la región bisagra de la cadena alfa de la glucoproteína CD8 de superficie de linfocitos T humanos (restos de aminoácido 117-178 de la SEQ ID NO. 13).

La SEQ ID NO. 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la región bisagra modificada derivada de la región bisagra de la cadena alfa de CD8 humana.

La SEQ ID NO. 3 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena zeta de la glucoproteína CD3 de superficie de linfocitos T humanos (número de acceso Swiss-Prot P20963 (CD3Z\_HUMANA); Isoforma 3).

25 La SEQ ID NO. 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la glucoproteína CD28 de superficie específica de linfocitos T humanos (número de acceso Swiss-Prot P10747 (CD28\_HUMANA)).

La SEQ ID NO. 5 muestra la secuencia de aminoácidos de la fusión del dominio transmembrana y el dominio intracelular de CD28 humana (restos de aminoácido 151-220 de la SEQ ID NO. 4) y el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana (restos de aminoácido 52-163 de SEQ ID NO. 3).

30 La SEQ ID NO. 6 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína multifuncional con los dominios (i) [péptido señal] - (ii) [scFv anti-ErbB2] - (iii) [bisagra modificada] - (iv) [dominio transmembrana e intracelular de la cadena zeta de CD3 humana].

35 La SEQ ID NO. 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína multifuncional con los dominios (i) [péptido señal] - (ii) [scFv anti-ErbB2] - (iii) [bisagra modificada] - (iv) [fusión del dominio transmembrana e intracelular de CD28 humana con el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana].

La SEQ ID NO. 8 muestra la secuencia de nucleótidos que codifica la región bisagra modificada en una forma de codones optimizados.

La SEQ ID NO. 9 muestra la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio transmembrana y el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana en una forma de codones optimizados.

40 La SEQ ID NO. 10 muestra la secuencia de nucleótidos que codifica la fusión del dominio transmembrana e intracelular de CD28 humana con el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana en una forma de codones optimizados.

45 La SEQ ID NO. 11 muestra la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína multifuncional con los dominios (i) [péptido señal] - (ii) [scFv anti-ErbB2] - (iii) [bisagra modificada] - (iv) [dominio transmembrana e intracelular de la cadena zeta de CD3 humana] en una forma de codones optimizados.

La SEQ ID NO. 12 muestra la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína multifuncional con los dominios (i) [péptido señal] - (ii) [scFv anti-ErbB2] - (iii) [bisagra modificada] - (iv) [fusión del dominio transmembrana e intracelular de CD28 humana con el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana] en una forma de codones optimizados.

50 La SEQ ID NO. 13 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa de la glucoproteína CD8 de superficie

de linfocitos T humanos (número de acceso Swiss-Prot P01732 (CD8A\_HUMANA)).

Los siguientes ejemplos y dibujos ilustran la presente invención sin limitar, sin embargo, la misma a ellos.

### **Breve descripción de los dibujos**

#### **Figura 1** *Región bisagra modificada derivada de la cadena alfa de CD8.*

Se muestran las secuencias de aminoácidos de las regiones bisagra original y modificada derivadas de la cadena alfa de CD8 humana. La cisteína desapareada y el resto modificado están subrayados.

#### **Figura 2** *Representación esquemática de la construcción de expresión.*

(A) La secuencia que codifica CAR específico de ErbB2 se expresa bajo el control de un promotor del virus formador de focos en el bazo (SFFV) y seguido por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y ADNc que codifica la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP). El CAR está compuesto por un péptido señal (SP) de la cadena pesada de inmunoglobulina, un fragmento de anticuerpo Fv de cadena sencilla (scFv), específico de ErbB2, la región bisagra de cadena alfa de CD8 no modificada o modificada como enlazador flexible (CD8 alfa) y el dominio transmembrana y el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 como dominio de señalización (zeta).

#### **Figura 3** *Análisis de la expresión superficial de CAR en células NK transducidas.*

Se transdujeron células NK con vectores lentivíricos que codificaban CAR específico de ErbB2 que contenía la región bisagra de la cadena alfa de CD8 no modificada (panel superior, gris oscuro) o modificada (panel inferior, gris oscuro). Las células modificadas con el gen se seleccionaron por clasificación basada en FACS. La expresión de CAR sobre la superficie de células NK se investigó por análisis FACS usando la proteína de fusión ErbB2-Fc. Las células NK transducidas con vector vacío sirvieron como control (gris claro).

#### **Figura 4** *Análisis de inmunotransferencia de la expresión de CAR.*

Lisados de células NK transducidas que expresaban CAR específico de ErbB2 que contenían la región bisagra de cadena alfa de CD8 modificada (carril 2) o no modificada (carril 3) se sometieron a SDS-PAGE en condiciones no reductoras y análisis de inmunotransferencia con anticuerpo anticadena zeta de CD3 según se indica. El lisado de células NK no transducidas sirvió como control (carril 1). Se indican monómeros y homodímeros de cadena zeta de CD3 endógena, heterodímeros de CAR-cadena zeta de CD3 y homodímeros de CAR.

#### **Figura 5** *Actividad citotóxica de células NK que expresan CAR.*

Se cocultivaron células NK que expresaban CAR específico de ErbB2 que contenían la región bisagra de la cadena alfa de CD8 modificada o no modificada a diferentes relaciones efector a diana (E:T) con células de control de eritroleucemia K562 sensibles a NK pero negativas a ErbB2 (A), células de carcinoma de mama MDA-MB468 negativas a ErbB2 (B) o células de carcinoma de mama MDA-MB453 positivas a ErbB2 (C). Como se muestra en (C), las células NK que expresan el CAR específico de ErbB2 con la región bisagra de cadena alfa de CD8 modificada mostraron eliminación celular específica de ErbB2 notablemente potenciada (barras abiertas) en comparación con células NK que expresaban el CAR específico de ErbB2 con la región bisagra de cadena alfa de CD8 no modificada (barras rellenas).

#### **Figura 6** *Células NK que expresan un CAR que contiene los dominios CD28 y de cadena zeta de CD3.*

(A) La secuencia que codifica el CAR específico de ErbB2 se expresa bajo el control de un promotor del virus formador de focos en el bazo (SFFV) y seguida por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y ADNc que codifica la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP). El CAR está compuesto de un péptido señal (SP) de cadena pesada de inmunoglobulina, un fragmento de anticuerpo Fv de cadena sencilla (scFv) específico de ErbB2, la región bisagra de cadena alfa de CD8 modificada como enlazador flexible (CD8 alfa) y CD28 y la cadena zeta de CD3 (zeta) como dominios de señalización.

(B) Se transdujeron células NK con el vector lentivírico mostrado en (A). Se seleccionaron células modificadas con el gen por clasificación basada en FACS. La expresión de CAR sobre la superficie de células NK se investigó por análisis FACS usando la proteína de fusión ErbB2-Fc (gris oscuro). Células NK no transducidas sirvieron como control (gris claro).

Las células NK que expresan CAR específico de ErbB2 que contenían la región bisagra de cadena alfa de CD8 modificada y CD28 y la cadena zeta de CD3 como dominios de señalización se cocultivaron a diferentes relaciones de efectora diana (E:T) con células de carcinoma de mama MDA-MB468 negativas a ErbB2 (C) o células de carcinoma de mama MDA-MB453 positivas a ErbB2 (D). Como se muestra en (D), las células NK que expresan el CAR específico de ErbB2 con la región bisagra de cadena alfa de CD8 modificada y CD28 y la cadena zeta de CD3 como dominios de señalización mostraron eliminación celular específica de ErbB2 (barras abiertas) en comparación con células NK no transducidas incluidas como control (barras rellenas).

### **Ejemplos**

#### **Ejemplo 1**

**Construcción de CAR.** Se mutó un fragmento de ADNc que codificaba la región bisagra derivada de la cadena alfa de CD8 humana por mutagénesis dirigida al sitio para remplazar el codón que codifica la cisteína desapareada de la región bisagra por un codón que codifica un resto de serina (Figura 1). Las secuencias que codifican un péptido señal de cadena pesada de inmunoglobulina, un fragmento de anticuerpo scFv específico para el antígeno de superficie asociado a tumor ErbB2, la región bisagra modificada derivada de la cadena alfa de CD8 humana y los dominios transmembrana e intracelular de la cadena zeta de CD3 humana se ensamblaron en una única fase de lectura abierta produciendo un ADNc que codifica un CAR específico de ErbB2. La secuencia codificante de CAR se insertó en el vector de transferencia lentivírico SIEW para la expresión en linfocitos bajo el control del promotor del virus formador de focos en el bazo (Figura 2). Para una comparación se produjo vector de transferencia lentivírico que codificaba un CAR similar que contenía la región bisagra no modificada derivada de la cadena alfa de CD8 humana.

**Transducción de células NK.** Se produjeron partículas de vector lentivírico pseudotipadas VSV-G por triple transfección transitoria de células 293T con el vector de transferencia junto con las construcciones de empaquetado pMD-VSVG y 8.91. Se usó el vector lentivírico para transducción de células NK y las células NK transducidas se enriquecieron por dos rondas de clasificación FACS basándose en la expresión de la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) como gen marcador codificado por el vector SIEW.

**Expresión superficial de CAR.** La expresión de CAR sobre la superficie de células NK transducidas y clasificadas por FACS se investigó por análisis FACS con una proteína de fusión ErbB2-Fc (R&D Systems) seguido por fragmento F(ab)<sub>2</sub> anti-Fc humano conjugado con APC. Las células NK transducidas por CAR que contenía la región bisagra de cadena alfa de CD8 modificada presentaban una mayor expresión superficial global de CAR en comparación con células NK que expresaban un CAR similar que contenía la región bisagra de cadena alfa de CD8 no modificada (Figura 3).

**Análisis de inmunotransferencia de expresión de CAR.** La expresión de CAR y la multimerización en células NK transducidas y clasificadas por FACS se investigó por análisis de inmunotransferencia. Se separaron las proteínas en lisados celulares de células transducidas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. El posterior análisis de inmunotransferencia con anticuerpo anticadena zeta de CD3 demostró una marcada reducción en el nivel de cadena zeta endógena desapareada y mayores niveles de heterodímeros de CAR-cadena zeta y homodímeros de CAR en muestras de células NK que expresaban CAR con la región bisagra de cadena alfa de CD8 modificada en comparación con células NK que expresaban un CAR similar que contenía la región bisagra de cadena alfa de CD8 no modificada (Figura 4).

**Actividad citotóxica de células NK que expresan CAR.** La actividad citotóxica de células NK que expresan CAR se midió en ensayos de citotoxicidad basados en FACS. Las células NK que expresaban CAR específico de ErbB2 que contenían la región bisagra de cadena alfa de CD8 modificada o no modificada presentaban actividad citotóxica similar hacia células de control de eritroleucemia K562 sensibles a NK pero negativas a ErbB2, pero ambas eran incapaces de lisar células de carcinoma de mama MDA-MB468 resistentes a NK y negativas a ErbB2. Cuando se ensayó la actividad citotóxica hacia células de carcinoma de mama MDA-MB453 positivas a ErbB2, las células NK que expresaban el CAR específico de ErbB2 con la región bisagra de cadena alfa de CD8 modificada mostraban eliminación celular específica de ErbB2 marcadamente potenciada en comparación con células NK que expresaban el CAR específico de ErbB2 con la región bisagra de cadena alfa de CD8 no modificada (Figura 5). Estos resultados demuestran que el CAR modificado posee funcionalidad potenciada.

## Ejemplo 2

**Construcción de CAR que contiene los dominios de señalización CD28 y cadena zeta de CD3.** Las secuencias que codifican un péptido señal de cadena pesada de inmunoglobulina, un fragmento de anticuerpo scFv específico para el antígeno de superficie asociado a tumores ErbB2, la región bisagra modificada derivada de la cadena alfa de CD8 humana descrita en el Ejemplo 1, los dominios transmembrana e intracelular de CD28 humana, y el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana se ensamblaron en una única fase de lectura abierta produciendo un ADNc que codifica CAR específico de ErbB2 que contiene los dominios de señalización de CD28 y cadena zeta de CD3. La secuencia que codifica CAR se introdujo en el vector de transferencia lentivírica SIEW para expresión en linfocitos bajo el control del promotor del virus formador de focos en el bazo (Figura 6A).

**Transducción de células NK.** Se produjeron partículas de vector lentivírico pseudotipadas VSV-G por triple transfección transitoria de células 293T con el vector de transferencia junto con las construcciones de empaquetado pMD-VSVG y 8.91. el vector lentivírico se usó para transducción de células NK y las células NK transducidas se enriquecieron por dos rondas de clasificación FACS basándose en la expresión de la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) como gen marcador codificado por el vector SIEW.

**Expresión superficial de CAR que contiene los dominios de señalización CD28 y cadena zeta de CD3.** La expresión de CAR que contiene los dominios de señalización de CD28 y cadena zeta de CD3 sobre la superficie de células NK transducidas y clasificadas por FACS se investigó por análisis FACS con una proteína de fusión ErbB2-Fc (R&D Systems) seguido por fragmento F(ab)<sub>2</sub> anti-Fc humano conjugado con APC. Las células NK transducidas con CAR que contenía la región bisagra de la cadena alfa de CD8 modificada y los dominios de señalización de

CD28 y cadena zeta de CD3 presentaban alta expresión superficial de CAR (Figura 6B).

**Actividad citotóxica de células NK que expresan un CAR que contiene los dominios de señalización de CD28 y cadena zeta de CD3.**

La actividad citotóxica de células NK que expresan un CAR que contiene la región bisagra de cadena alfa de CD8 modificada y los dominios de señalización de CD28 y cadena zeta de CD3 se midió en ensayos de citotoxicidad basados en FACS. Las células NK que expresan este CAR específico de ErbB2 y las células NK de control que no expresan un CAR ambas fueron incapaces de lisar células de carcinoma de mama MDA-MB468 resistentes a NK y negativas a ErbB2 (Figura 6C). Cuando se ensayó la actividad citotóxica hacia células de carcinoma de mama MDA-MB453 positivas a ErbB2, las células NK que expresaban el CAR específico de ErbB2 con la región bisagra de cadena alfa de CD8 modificada y los dominios de señalización de CD28 y cadena zeta de CD3 mostraron alta eliminación celular específica de ErbB2 mientras que las células NK de control que no expresaban un CAR fueron incapaces de lisar las células diana a un grado significativo (Figura 6D). Estos resultados demuestran que la funcionalidad de la región bisagra de cadena alfa de CD8 modificada se retiene como parte de un CAR que contiene los dominios de señalización de CD28 y cadena zeta de CD3.

**Materiales y procedimientos (para el Ejemplo 1 y 2)**

**Células y condiciones de cultivo.** Las células NK humanas se mantuvieron en medio X-VIVO10 suplementado con plasma humano al 5 % y 100 UI/ml de IL-2.

**Producción de vectores pseudotipados VSV-G en células 293T.** Se generaron partículas de vector por transfección transitoria de  $4 \times 10^6$  células HEK-293T con un sistema de tres plásmidos que consistía del plásmido de empaquetado que codificaba la proteína de envuelta VSV-G (pMD-VSVG), el plásmido de expresión de glucoproteína que codifica *gag* y *pol* (8.91) y el plásmido de transferencia que porta el gen de interés. Las células se transfectaron por transfección con fosfato cálcico usando un total de 20 µg de ADN plasmídico que consistía en 6,5 µg de *gag pol*, 3,5 µg de VSV-G y 10 µg de plásmidos de transferencia. Se añadieron gota a gota precipitados de ADN-fosfato cálcico a monocapas celulares y se añadió cloroquina 10 mM. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular que contenían partículas de vector lentivírico pseudotipado 48 h después. Los sobrenadantes se filtraron a esterilidad (filtro de 0,45 µm) y se usaron directamente para transducción de células NK.

**Transducción lentivírica.** Para la transducción, se sembraron  $5 \times 10^5$  células NK en un único pocillo de una placa de 6 pocillos. Se añadieron partículas de vector a las células en presencia de 8 µg/ml de polibreno y se centrifugaron durante 60 min a 1800 r.p.m. a 32 °C. A las 48 h después de la transducción, se analizaron las células por FACS para la expresión de EGFP y CAR.

**Análisis citométrico de flujo.** Para el análisis de la expresión de CAR, se incubaron células NK transducidas con 1 µg de la proteína de fusión ErbB2-Fc (R&D Systems) durante 1 h a 4 °C. Después las células se lavaron y se tñieron con un fragmento de anticuerpo F(ab)<sub>2</sub> secundario anti-Fc humano acoplado a APC durante 20 min a 4 °C. Las muestras se lavaron en tampón FACS (DPBS, FCS al 3 %) y se resuspendieron en 250 µl para el análisis FACS usando un citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences). Células NK no transducidas y células NK transducidas con vector lentivírico SIEW vacío sirvieron como control.

**Análisis de inmunotransferencia.** Se recogieron  $5 \times 10^6$  células NK y se sedimentaron. Después de lavar dos veces con DPBS, se añadieron 500 µl de tampón de lisis (Tris 20 mM, pH 7,3, NaCl 137 mM, glicerol al 10 %, Triton X-100 al 1 %, EDTA 2 mM, inhibidores de proteasa) al sedimento celular y se incubaron durante 20 min en hielo. Se retiraron los desechos celulares por centrifugación a 14.000 r.p.m. durante 10 min a 4 °C. Se añadió tampón de Lämmli sin adición de reactivos reductores a los sobrenadantes aclarados, y las muestras se sometieron a SDS-PAGE y análisis de inmunotransferencia con anticuerpo anticadena zeta de CD3 seguido por procedimientos convencionales.

**Ensayos de citotoxicidad basados en FACS.** Para investigar la actividad citotóxica de células NK precursoras y modificadas genéticamente (células efectoras, E) hacia diferentes líneas de células tumorales (células diana, T), se usó un ensayo de citotoxicidad basado en FACS. Se marcaron células diana con violeta de calceína AM (Molecular Probes, Invitrogen). Las células se recogieron, se contaron y se lavaron en tampón de lavado de calceína (RPMI1640). La cantidad de células se ajustó a  $4 \times 10^6$  células/ml, y se añadieron 1,5 µl de violeta de calceína AM disueltos en 42 µl de DMSO a las células. La tinción de las células se realizó durante 30 min en hielo. Después las células se lavaron tres veces con tampón de lavado de calceína y se ajustó la cantidad de células a  $5 \times 10^5$  células/ml. Para ensayar la actividad citotóxica de células NK modificadas genéticamente, se cocultivaron células efectoras y diana marcadas a diversas relaciones, efector a diana (E/T). En primer lugar, se sedimentaron las células efectoras, se contaron y se ajustó la cantidad de células a  $5 \times 10^6$  células/ml. Se prepararon diluciones apropiadas. Para experimentos de cocultivo, las células diana se resuspendieron en medio X-VIVO que contenía plasma humano al 5 % y 100 UI/ml de IL-2. Se cocultivaron 100 µl de células diana con 100 µl de células efectoras a diversas relaciones E/T durante 2 h a 37 °C. Después las muestras se lavaron una vez en tampón FACS. Se determinó la lisis espontánea de células diana, en muestras que contenían solamente células diana marcadas. Se añadieron 250 µl de solución de yoduro de propidio (1 µg/ml) a las muestras poco antes de la medición. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences). El porcentaje de células diana muertas se determinó usando el software FACSDiVa (BD Biosciences).

**Referencias**

Uherek C, Groner B, Wels W. Chimeric antigen receptors for the retargeting of cytotoxic effector cells. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 10: 523-543, 2001.

5 Uherek C, Tonn T, Uherek B, Becker S, Schnierle B, Klingemann HG, Wels W. Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2 expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction. *Blood* 100:1265-1273, 2002.

Fitzer-Attas CJ, Schindler DG, Waks T, Eshhar Z. Harnessing Syk family tyrosine kinases as signaling domains for chimeric single chain of the variable domain receptors: optimal design for T cell activation. *J Immunol.* 160(1):145-154, 1998.

10 Müller T, Uherek C, Maki G, Chow KU, Schimpf A, Klingemann HG, Tonn T, Wels WS. Expression of a CD20-specific chimeric antigen receptor enhances cytotoxic activity of NK cells and overcomes NK-resistance of lymphoma and leukemia cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 57: 411-423, 2008.

Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science.* 2006 Oct 6; 314(5796): 126-9.

15 Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2008 Abr; 8(4):299-308.

Nolan KF, Yun CO, Akamatsu Y, Murphy JC, Leung SO, Beecham EJ, Junghans RP. Bypassing immunization: Optimized design of "designer T cells" against carcinoembryonic antigen (CEA)-expressing tumors, and lack of suppression by soluble CEA. *Clin Cancer Res.* 1999 Dic; 5(12):3928-41.

20

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Chemotherapeutisches Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus

<120> Receptores de antígenos quiméricos con una región bisagra optimizada

<130> C31588PCT

30 <160> 13

<170> PatentIn versión 3.3

35 <210> 1

<211> 62

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40 <400> 1

Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe  
1 5 10 15

Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro  
20 25 30

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys  
35 40 45

Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp  
50 55 60

<210> 2

<211> 62



ES 2 602 743 T3

<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Región bisagra modificada

<400> 2

Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe  
1 5 10 15

Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro  
20 25 30

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser  
35 40 45

Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp  
50 55 60

10 <210> 3  
<211> 163  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 3

ES 2 602 743 T3

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu  
 1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys  
 20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala  
 35 40 45

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr  
 50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg  
 65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met  
 85 90 95

Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu  
 100 105 110

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys  
 115 120 125

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu  
 130 135 140

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu  
 145 150 155 160

Pro Pro Arg

<210> 4  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val  
 1 5 10 15

Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr  
 20 25 30

5

10

ES 2 602 743 T3

Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser  
 35 40 45

Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu  
 50 55 60

Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser  
 65 70 75 80

Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr  
 85 90 95

Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys  
 100 105 110

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser  
 115 120 125

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro  
 130 135 140

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly  
 145 150 155 160

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile  
 165 170 175

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met  
 180 185 190

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro  
 195 200 205

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
 210 215 220

<210> 5  
 <211> 182  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> secuencia de aminoácidos de la fusión del dominio transmembrana y del dominio intracelular de CD28 humana (restos de aminoácidos 151-220 de SEQ ID NO. 4) y del dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana (restos de aminoácidos 52-163 de SEQ ID NO. 3)

10

<400> 5

ES 2 602 743 T3

Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr  
 1                      5                                      10    15

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys  
                     20                                      25    30

Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg  
                     35                                      40    45

Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp  
                     50                                      55    60

Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala  
                     65                                      70    75    80

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu  
                                     85    90    95

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp  
                                     100    105    110

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu  
                     115                                      120    125

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile  
                     130                                      135    140

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr  
                     145                                      150    155    160

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met  
                                     165    170    175

Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
                                     180

- <210> 6
- <211> 457
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> secuencia de aminoácidos de la proteína multifuncional con los dominios (i) [péptido señal] - (ii) [anti-ErbB2scFv] - (iii)[bisagra modificada] - (iv)[dominio transmembrana e intracelular de la cadena zeta de CD3 humana]
- <400> 6

ES 2 602 743 T3

Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly  
1                    5                                    10    15

ES 2 602 743 T3

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys  
20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe  
35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn  
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Thr  
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp  
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser  
145 150 155 160

His Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys  
165 170 175

Lys Ala Ser Gln Asp Val Tyr Asn Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
180 185 190

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr  
195 200 205

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe  
210 215 220

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe  
225 230 235 240

Cys Gln Gln His Phe Arg Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys  
245 250 255

Leu Glu Ile Lys Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe  
260 265 270

ES 2 602 743 T3

Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg  
 275 280 285

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg  
 290 295 300

Pro Glu Ala Ser Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly  
 305 310 315 320

Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr  
 325 330 335

Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser  
 340 345 350

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu  
 355 360 365

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg  
 370 375 380

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln  
 385 390 395 400

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr  
 405 410 415

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp  
 420 425 430

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala  
 435 440 445

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 450 455

<210> 7  
 <211> 504  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> secuencia de aminoácidos de la proteína multifuncional con los dominios (i) [péptido señal] - (ii) [anti-ErbB2 scFv] - (iii)[bisagra modificada] - (iv)[fusión del dominio transmembrana e intracelular de CD28 humana con el dominio intracelular]

10

<400> 7

ES 2 602 743 T3

Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys  
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe  
 35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Thr  
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp  
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser  
 145 150 155 160

His Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys  
 165 170 175

Lys Ala Ser Gln Asp Val Tyr Asn Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
 180 185 190

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr  
 195 200 205

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe  
 210 215 220

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe  
 225 230 235 240

Cys Gln Gln His Phe Arg Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys  
 245 250 255



ES 2 602 743 T3

Leu Glu Ile Lys Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe  
                   260                                  265                                  270

Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg  
                   275                                  280                                  285

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg  
                   290                                  295                                  300

Pro Glu Ala Ser Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly  
 305                                  310                                  315                                  320

Leu Asp Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala  
                                   325                                  330

Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg  
                                   340                                  345                                  350

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro  
                   355                                  360                                  365

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro  
                   370                                  375                                  380

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala  
 385                                  390                                  395                                  400

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu  
                                   405                                  410

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly  
                                   420                                  425                                  430

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu  
                   435                                  440                                  445

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser  
                   450                                  455                                  460

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly  
 465                                  470                                  475                                  480

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu  
                                   485                                  490                                  495

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

ES 2 602 743 T3

<210> 8  
 <211> 186  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> secuencia de nucleótidos que codifica la región bisagra modificada en una forma optimizada por codones

10

<400> 8

```

    gccctgagca acagcatcat gtacttcagc cacttcgtgc ccgtgtttct gcccgccaag      60
    cccaccacca ccctgcccc cagacccctt accccagccc ccacaatcgc cagccagccc      120
    ctgagcctga ggccccagggc cagcagacct gccgctgggg gagccgtgca caccaggggc      180
    ctggac                                          186
  
```

15

<210> 9  
 <211> 408  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20

<220>  
 <223> secuencia de nucleótidos que codifica el dominio transmembrana y el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana en una forma optimizada por codones

<400> 9

```

    cccaagctgt gctacctgct ggacggcatt ctgttcattt acggcgtgat cctgaccgcc      60
    ctgttcctga gagtgaagtt cagccgcagc gccgacgccc ctgcctacca gcagggccag      120
    aaccagctgt acaacgagct gaacctgggc aggcgggagg aatacgacgt gctggacaag      180
    cgagagggcc gggaccctga gatggggcgc aagcccaggg ggaagaacct ccaggaaggg      240
    ctgtataacg aactgcagaa agacaagatg gccgaggcct acagcgagat eggcatgaag      300
    ggcgagcggc gacgcggcaa gggccacgac ggctgtacc aggcctgtc caccgccacc      360
    aaggacacct acgacgcctt gcacatgcag gccctgcctc cccgttaa                    408
  
```

25

<210> 10  
 <211> 549  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30

<220>  
 <223> secuencia de nucleótidos que codifica la fusión del dominio transmembrana e intracelular de CD28 humana con el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana en una forma optimizada por codones

35

<400> 10

```

    aagcccttct ggggtctggt cgtggctcggc ggagtgetgg cctgttacag cctgetggtc      60
    accgtggcct tcatcatctt ttgggtccgc agcaagcggg gccggctgct gcacagcgac      120
  
```

ES 2 602 743 T3

```

tacatgaaca tgacccaag gggccaggc cccaccgga agcactacca gccctatgcc 180
cctcctaggg acttcgccgc ctaccggtcc agagtgaagt tcagccgcag cgcgcagccc 240
cctgcctacc agcagggcca gaaccagctg tacaacgagc tgaacctggg caggcgggag 300
gaatacgacg tgctggacaa gcgcagaggc cgggaccctg agatggggcg caagcccagg 360
cggaagaacc cccaggaagg cctgtataac gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc 420
tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagcgg cgacgcggca agggccacga cggcctgtac 480
cagggcctgt ccaccgccac caaggacacc tacgacgcc tgcacatgca ggccctgcct 540
ccccgttaa 549

```

- 5 <210> 11
- <211> 1374
- <212> ADN
- <213> Artificial
  
- 10 <220>
- <223> secuencia de nucleótidos que codifica la proteína multifuncional con los dominios (i) [péptido señal] - (ii) [anti-ErbB2 scFv] - (iii)[bisagra modificada] - (iv)[dominio transmembrana e intracelular de la cadena zeta de CD3 humana] en una forma optimizada por codones.
  
- <400> 11

ES 2 602 743 T3

atggactgga tctggcggat tctgttcctg gtcggggctg ccacaggcgc ccacagccag 60  
gtgcagctgc agcagagcgg ccctgagctg aagaagcccg gcgagacagt caagatcagc 120  
tgcaaggcca ggggctaccc cttcaccaac tacggcatga actgggtgaa acaggcccca 180  
ggccagggac tgaagtggat gggctggatc aacaccagca ccggcgagag caccttcgcc 240  
gacgacttca agggcagatt cgacttcagc ctggaacca gcgccaacac cgcctacctg 300  
cagatcaaca acctgaagag cgaggacagc gccacctact tttgcgccag atgggaggtg 360  
taccacggct acgtgcccta ctggggccag ggcaccaccg tgaccgtgtc cagcggcggga 420  
gggggctctg gggcgaggag atctggggga gggggcagcg acatccagct gacccagagc 480  
cacaagtffc tgagcaccag cgtgggcgac cgggtgtcca tcacctgcaa agccagccag 540  
gacgtgtaca acgccgtggc ctggtatcag cagaagcctg gccagagccc caagctgctg 600  
atctacagcg ccagcagccg gtacaccggc gtgcccagca ggttcaccgg cagcggcagc 660  
ggcccagact tcaccttcac catcagcagc gtgcaggccg aggacctggc cgtgtacttc 720  
tgccagcagc acttccggac ccccttcacc ttcggctccg gcaccaagct ggaaatcaag 780  
gccctgagca acagcatcat gtacttcagc cacttcgtgc ccgtgtttct gcccgccaag 840  
cccaccacca cccctgcccc cagacccctt accccagccc ccacaatcgc cagccagccc 900  
ctgagcctga ggcccagggc cagcagacct gccgctgggg gagccgtgca caccaggggc 960  
ctggaccca agctgtgcta cctgctggac ggcacctgtt tcactacgg cgtgatcctg 1020  
accgccctgt tcctgagagt gaagttcagc cgcagcgcgg acgcccctgc ctaccagcag 1080  
ggccagaacc agctgtacaa cgagctgaac ctgggcaggg gggaggaata cgacgtgctg 1140  
gacaagcgcga gaggccggga ccctgagatg ggcggcaagc ccaggcggaa gaacccccag 1200  
gaaggcctgt ataacgaact gcagaaagac aagatggccg aggcctacag cgagatcggc 1260  
atgaagggcg agcggcgacg cggcaagggc cagcagggcc tgtaccaggg cctgtccacc 1320  
gccaccaagg acacctacga cgccctgcac atgcaggccc tgccctcccg ttaa 1374

- 5 <210> 12
- <211> 1515
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> secuencia de nucleótidos que codifica la proteína multifuncional con los dominios (i) [péptido señal] - (ii) [anti-ErbB2 scFv] - (iii)[bisagra modificada] - (iv)[fusión del dominio transmembrana e intracelular de CD28 humana con el dominio intracelular
- <400> 12

ES 2 602 743 T3

atggactgga tctggcggat tctgttcctg gtcggggctg ccacaggcgc ccacagccag 60  
 gtgcagctgc agcagagcgg ccctgagctg aagaagcccg gcgagacagt caagatcagc 120  
 tgcaaggcca gcggtaccc cttaccaaac tacggcatga actgggtgaa acaggcccca 180  
 ggccagggac tgaagtggat gggctggatc aacaccagca cggcgagag caccttcgcc 240  
 gacgacttca agggcagatt cgacttcagc ctggaaacca gcgccaacac cgcctacctg 300  
 cagatcaaca acctgaagag cgaggacagc gccacctact tttgcgccag atgggaggtg 360  
 taccacggct acgtgcccta ctggggccag ggcaccaccg tgaccgtgtc cagcggcggg 420  
 gggggctctg gcggcggagg atctggggga gggggcagcg acatccagct gaccagagc 480  
 cacaagtffc tgagcaccag cgtgggcgac cgggtgtcca tcacctgcaa agccagccag 540  
 gacgtgtaca acgccgtggc ctggtatcag cagaagcctg gccagagccc caagctgctg 600  
 atctacagcg ccagcagccg gtacaccggc gtgccagca ggttcaccgg cagcggcagc 660  
 ggcccagact tcaccttcac catcagcagc gtgcaggccg aggacctggc cgtgtacttc 720  
 tgccagcagc acttccggac ccccttcacc ttcggctccg gcaccaagct ggaaatcaag 780  
 gccctgagca acagcatcat gtacttcagc cacttcgtgc ccgtgtttct gcccgccaag 840  
 cccaccacca cccctgcccc cagacccctt accccagccc ccacaatcgc cagccagccc 900  
 ctgagcctga ggcccagggc cagcagacct gccgctgggg gagccgtgca caccaggggc 960  
 ctggacaagc ccttctgggt gctggtcgtg gtcggcggag tgctggcctg ttacagcctg 1020  
 ctggtacccg tggccttcat catcttttgg gtcgcagca agcggagccg gctgctgcac 1080  
 agcgactaca tgaacatgac cccaaggcgg ccaggcccca cccggaagca ctaccagccc 1140  
  
 tatgcccctc ctagggactt cgccgcctac cggccagag tgaagttcag ccgcagcgc 1200  
 gacgcccctg cctaccagca gggccagaac cagctgtaca acgagctgaa cctgggcagg 1260  
 cgggaggaat acgacgtgct ggacaagcgc agaggccggg accctgagat gggcggcaag 1320  
 cccagcggga agaaccocca ggaaggcctg tataacgaac tgcagaaaga caagatggcc 1380  
 gaggcctaca gcgagatcgg catgaagggc gagcggcgac gcggcaaggg ccacgacggc 1440  
 ctgtaccagg gcctgtccac cgccaccaag gacacctacg acgcctgca catgcaggcc 1500  
 ctgcctcccc gttaa 1515

<210> 13  
 <211> 235  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

5

ES 2 602 743 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr  
20 25 30

Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser  
35 40 45

Asn Pro Thr Ser Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala  
50 55 60

Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala  
65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp  
85 90 95

Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr  
100 105 110

Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe  
115 120 125

Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg  
130 135 140

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg  
145 150 155 160

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly  
165 170 175

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr  
180 185 190

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His  
195 200 205

Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser  
210 215 220

Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val  
225 230 235

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína que comprende
- 5 (i) un péptido señal;  
(ii) un dominio de reconocimiento específico de diana;  
(iii) una región enlazadora, que conecta el dominio (ii) y el dominio (iv),  
en la que la región enlazadora no contiene resto o restos de cisteína y se selecciona de cualquiera de los siguientes:
- 10 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2,  
una secuencia de aminoácidos con al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 2, con la condición de que el resto de aminoácido 48 no sea una cisteína y sea una serina,  
y  
una secuencia de aminoácidos que difiere en uno, dos o tres restos de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2, con la condición de que el resto de aminoácido 48 no sea una cisteína y sea una serina; y
- 15 (iv) un dominio efector que comprende una región transmembrana y uno o más dominios de señalización intracelular, en la que el dominio efector (iv) comprende o es una fusión del dominio transmembrana e intracelular de CD28 humana con el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana.
2. La proteína de la reivindicación 1, en la que la diana es una célula o un virus y en la que el dominio de reconocimiento específico de antígeno (ii) se une a un antígeno, receptor, ligando peptídico o ligando proteico de la diana.
- 20 3. La proteína de la reivindicación 1 o 2, en la que el dominio de reconocimiento específico de diana (ii) comprende
- 25 - un dominio de unión a antígeno derivado de un anticuerpo contra un antígeno de la diana, o  
- un péptido que se une a un antígeno de la diana, o  
- un péptido o proteína que se une a un anticuerpo que se une a un antígeno de la diana, o  
- un ligando peptídico o proteico (tal como un factor de crecimiento, una citoquina o una hormona) que se une a un receptor en la diana, o  
- un dominio derivado de un receptor (tal como un receptor de factor de crecimiento, un receptor de citoquina o un receptor de hormona) que se une a un ligando peptídico o proteico en la diana.
- 30 4. La proteína de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el antígeno de la diana es un antígeno de superficie asociado a tumor, un antígeno de superficie específico de linaje o específico de tejido o un antígeno de superficie específico de virus.
- 35 5. La proteína de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el dominio de unión a antígeno del dominio (ii) se obtiene de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), fragmento Fab, un diacuerpo, un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo o cadena ligera de anticuerpo.
6. La proteína de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el dominio efector (iv) comprende o es una fusión del dominio transmembrana e intracelular de CD28 humana con el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 humana con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 5; o un equivalente funcional de la misma.
- 40 7. La proteína de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 7,  
o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 7, con la condición de que el resto de aminoácido n.º 308 no sea una cisteína y sea una serina.
8. Un ácido nucleico que codifica la proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 45 9. El ácido nucleico de la reivindicación 8, que comprende el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2 o que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO. 8 o sus secuencias complementarias o secuencias que tienen al menos un 95 % de identidad de secuencia.
- 50 10. El ácido nucleico de la reivindicación 8 o 9, que comprende el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 5 o que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO. 10 o sus secuencias complementarias o secuencias que tienen al menos un 95 % de identidad de secuencia.
11. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 7 o la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO. 12, o sus secuencias complementarias o secuencias que tienen al menos un 95 % de identidad de secuencia.

12. Una construcción de expresión para expresar la proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en una célula, preferentemente que comprende adicionalmente secuencias promotoras y terminadoras.
- 5 13. Una célula huésped que expresa una proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o que comprende un ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 o una construcción de expresión de la reivindicación 12,
- que se selecciona de células efectoras del sistema inmunitario, y en la que las células efectoras del sistema inmunitario son células asesinas naturales (NK), linfocitos T asesinos naturales (NKT) o una preparación de linfocitos que contiene células NK y células NKT.
- 10 14. Uso "*in vitro*" de una proteína de las reivindicaciones 1 a 7, de un ácido nucleico de las reivindicaciones 8 a 11 o de una construcción de expresión de la reivindicación 12 para generar células efectoras específicas de diana.
- 15 15. La proteína de las reivindicaciones 1 a 7, el ácido nucleico de las reivindicaciones 8 a 11, la construcción de expresión de la reivindicación 12 o la célula huésped de la reivindicación 13 para su uso como medicamento.
16. La proteína de las reivindicaciones 1 a 7, el ácido nucleico de las reivindicaciones 8 a 11, la construcción de expresión de la reivindicación 12 o la célula huésped de la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento del cáncer o para su uso en inmunoterapia adoptiva específica de célula diana.



**Figura 1**

**Secuencia de aminoácidos de la región de bisagra derivada de la cadena alfa de CD8**

ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD

**Secuencia de aminoácidos de la bisagra modificada derivada de la cadena alfa de CD8**

ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLD

Figura 2 A

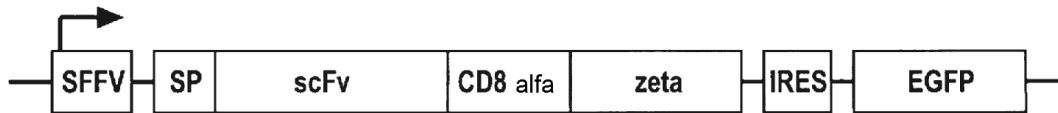


Figura 3

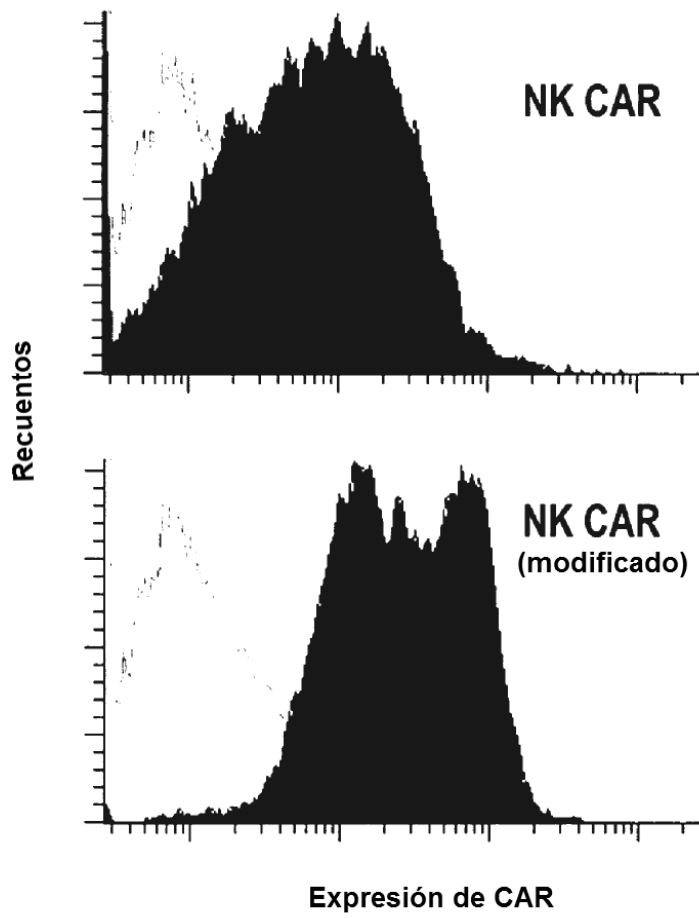


Figura 4

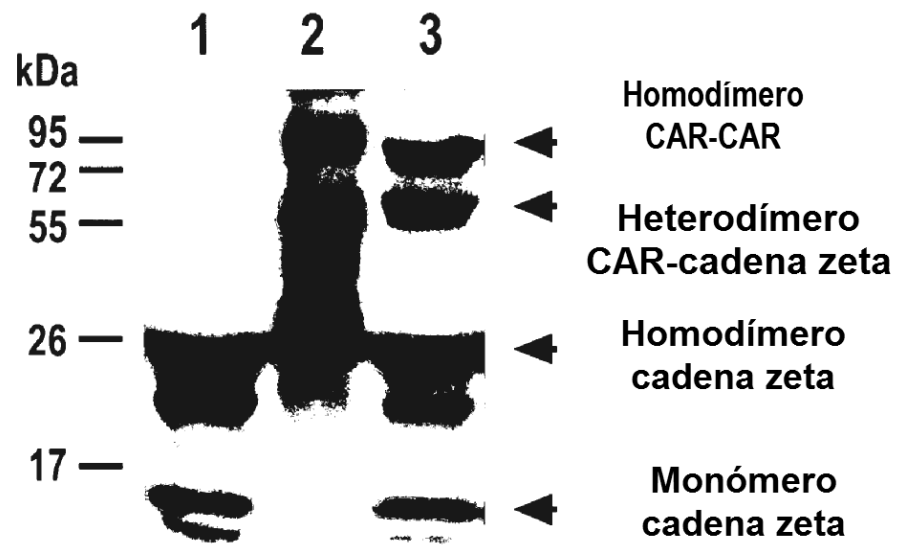


Figura 5

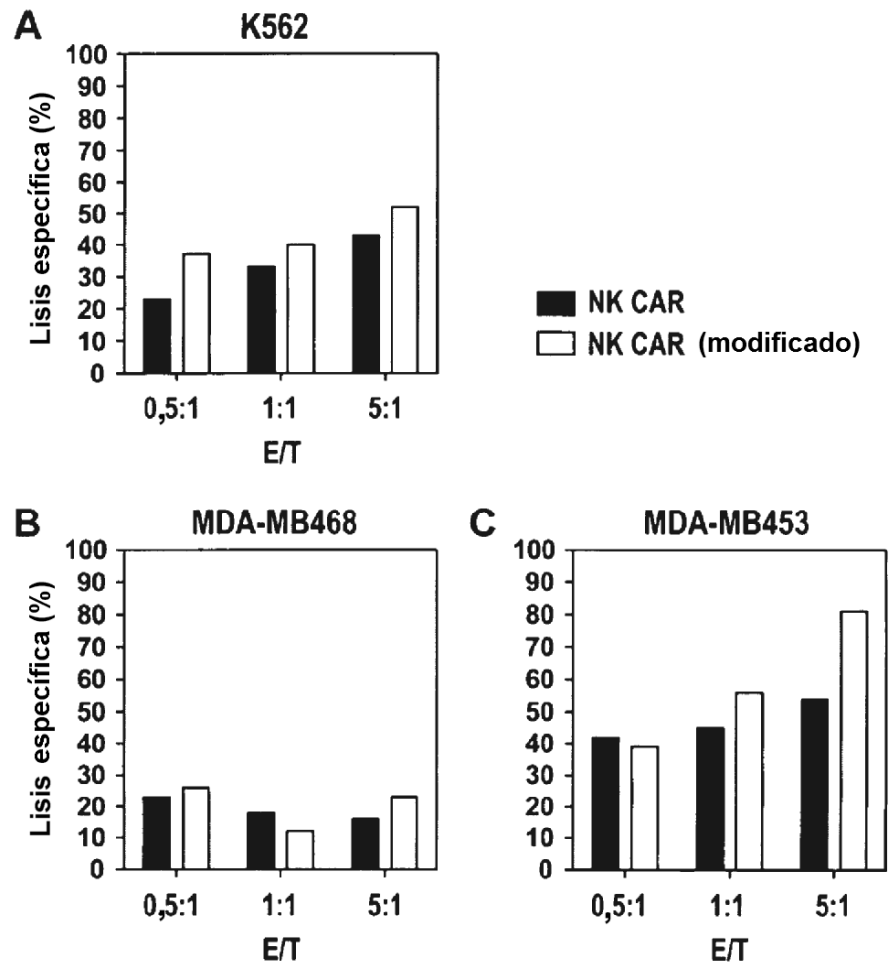


Figura 6

