(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 703 747**

(51) Int. Cl.:

***C07K 14/705*** (2006.01)
***C07K 14/725*** (2006.01)
***C07K 16/28*** (2006.01)
***C07K 16/30*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2013** **PCT/US2013/076486**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014** **WO14100385**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2013** **E 13865885 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018** **EP 2935321**

(54) Título: **Receptores de antígenos quiméricos**

(30) Prioridad:

**20.12.2012 US 201261740113 P**
**13.03.2013 US 201361779925 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**12.03.2019**

(73) Titular/es:

**CELGENE CORPORATION (100.0%)**
**86 Morris Avenue**
**Summit, NJ 07901, US**

(72) Inventor/es:

**ABBOT, STEWART;**
**LIANG, BITAO y**
**LI, TIANJIAN**

(74) Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 703 747 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

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 61/740.113, presentada el 20 de diciembre de 2012, y la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 61/779.925, presentada el 13 de marzo de 2013.

### 1. Campo

La descripción de la presente memoria se refiere al campo de la inmunología, y más específicamente a la modificación de linfocitos T u otras células inmunitarias.

### 2. Antecedentes

Las células del sistema inmunitario tales como los linfocitos T (también denominados células T) reconocen e interaccionan con antígenos específicos a través de receptores o complejos receptores que, tras el reconocimiento o una interacción con dichos antígenos, producen activación de la célula. Un ejemplo de dicho receptor es el complejo de receptor de linfocito T específico de antígeno (TCR/CD3), un complejo de ocho proteínas. El receptor de células T (TCR) se expresa en la superficie de los linfocitos T. Un componente, CD3, que tiene una estructura invariante, es responsable de la señalización intracelular después de la ocupación del TCR por el ligando. El receptor de linfocitos T para el complejo antígeno-CD3 (TCR/CD3) reconoce péptidos antígenos que son presentados al mismo por las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los complejos del MHC y el péptido son expresados en la superficie de células presentadoras de antígeno y otras dianas de linfocitos T. La estimulación del complejo TCR/CD3 da como resultado la activación del linfocito T y una consiguiente respuesta inmunitaria específica de antígeno. El complejo TCR/CD3 tiene un papel central en la función efectora y regulación del sistema inmunitario.

Los linfocitos T requieren una segunda señal coestimuladora para volverse completamente activos. Sin dicha señal, los linfocitos T o bien no son sensibles a la unión del antígeno al TCR o se vuelven anérgicos. Dicha señal coestimuladora, es proporcionada, por ejemplo, por CD28, una proteína de linfocitos T, que interacciona con CD80 y CD86 en células productoras de antígeno. ICOS (Coestimulador inducible, por sus siglas en inglés Inducible COStimulator), otra proteína de linfocitos T, proporciona una señal coestimuladora cuando se une al ligando de ICOS. CTLA4 (antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico), también conocido como CD152, es un receptor expresado en la superficie de células T cooperadoras y células T CD4+, que regula por disminución la actividad de las células T. La unión de CTLA4 a sus ligandos cognados, CD80 y CD86, da como resultado una menor activación y proliferación de células T. PD-1 (muerte celular programada 1), también conocido como CD279, se entiende actualmente que regula de forma negativa las señales del receptor de células T (TCR), y que regula de forma negativa ampliamente respuestas inmunitarias.

Las funciones esenciales de unión al antígeno, señalización y estimuladora del complejo TCR se han reducido por métodos de recombinación genética a una sola cadena de polipéptido, denominada en general como receptor de antígeno quimérico (CAR). Véase, p. ej., Eshhar, patente de EE.UU. nº 7.741.465; Eshhar, publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2012/0093842. Los linfocitos T que llevan dichos CAR en general se denominan CAR-linfocitos T. Los CAR se construyen específicamente para estimular la activación y proliferación de células T en respuesta a un antígeno específico al que se une el CAR.

Fitzer-Attas, Ch. J. et al. (1998) (*The Journal of Immunology*, vol, 160, nº 1, 145-154) se refiere a receptores quiméricos que se unen a un Fv monocatenario extracelular (scFv) de un Ac específico o reconocimiento de Ag a una proteína tirosina quinasa (PTK) intracelular para la propagación de señal. El documento WO 02/33101 (Finney, H.M. et al) describe ácidos nucleicos que codifican moléculas de señalización citoplasmáticas quiméricas derivadas de CD137, los ácidos nucleicos pueden ser expresados en células para producir receptores quiméricos y otras proteínas que son capaces de regular los procesos de activación celular. Shin, J.H. et al. (2012) (*Blood*, vol. 119: 5678-5697) se refieren a un mutante del antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4) denominado quimera CTLA4-CD28 que consiste en dominios extracelulares y transmembrana de CTLA4, unidos al dominio CD28 citoplasmático, diseñado para suministrar una señal positiva en lugar de la señal negativa de CTLA4 y competir con el CTLA4 endógeno por la unión a su ligando de una forma negativa dominante. Se dice que cuando la quimera es expresada en células T específicas de antígeno tumoral, potencia el efecto antitumoral sin autoinmunidad sistémica.

### 3. Resumen

La presente invención proporciona un polipéptido que comprende (i) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1, (ii) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ, y (iii) un dominio extracelular que se une a un antígeno en una célula tumoral, en donde dicho polipéptido es un receptor de antígeno quimérico (CAR) y un linfocito T que expresa dicho polipéptido es activado o estimulado para proliferar cuando dicho polipéptido se une a dicho antígeno, y en donde si el dominio transmembrana es de CTLA4, el dominio extracelular de dicho polipéptido no es de CTLA4; y si el dominio transmembrana es de PD-1, el dominio extracelular de dicho polipéptido no es de PD-1.

En algunas realizaciones, cuando el polipéptido de la invención es expresado en la superficie de un linfocito T, dirige al linfocito T para matar una célula que expresa dicho antígeno. En otra realización del polipéptido de la invención, el dominio transmembrana de CTLA4 es la secuencia de polipéptido codificada por el exón 3 de un gen *CTLA4* humano. En otra realización del polipéptido de la invención, dicho dominio extracelular es un anticuerpo o una parte del mismo de unión al antígeno. En otra realización del polipéptido de la invención, dicho antígeno es un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor.

En algunas realizaciones del polipéptido de la invención dicho antígeno asociado a tumor o antígeno específico de tumor es Her2, antígeno de citoblastos prostáticos (PSCA), alfa-fetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer-125 (CA-125), CA19-9, calretinina, MUC-1, proteína de membrana epitelial (EMA), antígeno tumoral epitelial (ETA), tirosinasa, antígeno asociado a melanoma (MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del fluido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, proteína melan-A (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T; MART-1), myo-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo-1, la forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (tumor M2-PK), CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante del factor de crecimiento epidérmico III), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteina, TARP (proteína de marco de lectura alternativo de receptor de células T gamma), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembranales de la próstata 1), una proteína Ras anormal, una proteína p53 anormal, integrina αvβ3 (CD61), galactina, K-Ras (oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2) o Ral-B.

En otra realización del polipéptido de la invención, dicho polipéptido comprende adicionalmente uno o más dominios coestimuladores. En algunas realizaciones dichos uno o más dominios coestimuladores comprenden uno o más de una secuencia de polipéptido CD27 coestimulador, una secuencia de polipéptido CD28 coestimulador, una secuencia de polipéptido OX40 (CD134) coestimulador, una secuencia de polipéptido 4-1BB (CD137) coestimulador, o una secuencia de polipéptido de coestimulador inducible (ICOS) de células T coestimulador.

En otra realización, dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de unión al antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28 o CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1; (iv) un dominio coestimulador; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización, dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización, dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización, dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización, dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización, dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de PD-1; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización, dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de PD-1; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un linfocito T que comprende el polipéptido de la invención.

En lo sucesivo, la referencia a un polipéptido en el contexto de la invención y sus realizaciones, significará el polipéptido como se ha definido antes.

En un aspecto, se proporcionan en la presente memoria polipéptidos, que son receptores de antígenos quiméricos (véase p. ej., Eshhar, patente de EE.UU. nº 7.741.465), que pueden ser expresados por linfocitos T (células T), se unen a la membrana en dichas células T, y que comprenden un dominio transmembrana de CTLA4 (antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico o proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico) o PD-1 (muerte celular programada-1).

En una realización, se proporciona en la presente memoria un polipéptido que comprende (i) un dominio transmembrana que comprende el dominio transmembrana de CTLA4 (p. ej., nº de acceso en GenBank NM_005214.4 (CTLA4 proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico (*Homo sapiens*); ID de gen: 1493)) o PD-1 (p. ej., nº de acceso en GenBank NM_005018.2 (muerte celular programada 1 (*Homo sapiens*-); ID de gen: 5133)), (ii) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ (p. ej., dominio citoplasmático) que produce la activación y/o proliferación de linfocitos, y (iii) un dominio extracelular que se une a un antígeno de interés, en donde si el dominio transmembrana es de CTLA4, el dominio extracelular de dicho polipéptido no es de CTLA4; y si el dominio transmembrana es de PD-1, el dominio extracelular de dicho polipéptido no es de PD-1, en donde el polipéptido es un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde un linfocito T que expresa dicho polipéptido, o cualquiera de dichos polipéptidos descritos en la presente memoria, es activado o estimulado para proliferar cuando dicho polipéptido se une a dicho antígeno. En una realización específica, el polipéptido, cuando es expresado en la superficie de un linfocito T, dirige al linfocito T a matar una célula que expresa dicho antígeno.

En una realización específica, se proporciona en la presente memoria un polipéptido que comprende un dominio transmembrana de CTLA4, en donde el dominio transmembrana de CTLA4 es la secuencia de polipéptido codificada por el exón 3 de un gen *ctla4* humano (p. ej., nº de acceso en GenBank NM_005214.4 (CTLA4 proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico *(Homo sapiens);* ID de gen: 1493)).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de aminoácidos PEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKM (en el código de tres letras, Pro-Glu-Pro-Cys-Pro-Asp-Ser-Asp-Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Ser-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Leu-Thr-Ala-Val-Ser-Leu-Ser-Lys-Met) (SEQ ID NO: 1).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de polipéptido codificada por los nucleótidos 610-722 de nº de acceso en GenBank NM_005214.4 (CTLA4 proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico (*Homo sapiens*); ID de gen: 1493).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de aminoácidos PDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSL (en el código de tres letras, Pro-Asp-Ser-Asp-Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Ser-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Leu-Thr-Ala-Val-Ser-Leu) (SEQ ID NO: 2).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de polipéptido codificada por los nucleótidos 636-699 de nº de acceso en GenBank NM_005214.4 (CTLA4 proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico (*Homo sapiens*); ID de gen: 1493).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de aminoácidos FLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAV (en el código de tres letras, Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Ser-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Leu-Thr-Ala-Val) (SEQ ID NO: 3)

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de polipéptido FLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (en el código de tres letras, Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Ser-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Leu-Thr) (SEQ ID NO: 4).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de polipéptido FLLWILVAVSLGLFFYSFLVSAVSLS (en el código de tres letras, Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Val-Ala-Val-Ser-Leu-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Val-Ser-Ala-Val-Ser-Leu-Ser) (SEQ ID NO: 5).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de polipéptido LGIGNGTQIYVIDPEPSPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKM (en el código de tres letras, Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met) (SEQ ID NO: 9).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de polipéptido FLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKM (en el código de tres

letras, Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met) (SEQ ID NO: 10).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de PD-1 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de aminoácidos TLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAA (en el código de tres letras, Thr-Leu-Val-Val-Gly-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Leu-Gly-Ser-Leu-Val-Leu-Leu-Val-Trp-Val-Leu-Ala-Val-Ile-Cys-Ser-Arg-Ala-Ala) (SEQ ID NO: 6).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de PD-1 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de aminoácidos VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI (en el código de tres letras, Val-Gly-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Leu-Gly-Ser-Leu-Val-Leu-Leu-Val-Trp-Val-Leu-Ala-Val-Ile) (SEQ ID NO: 7).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de PD-1 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de aminoácidos FQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI (en el código de tres letras, Phe-Glu-Thr-Leu-Val-Val-Gly-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Leu-Gly-Ser-Leu-Val-Leu-Leu-Val-Trp-Val-Leu-Ala-Val-Ile) (SEQ ID NO: 8).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de PD-1 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de aminoácidos FQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAA (en el código de tres letras, Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala) (SEQ ID NO: 11).

Como se ilustra mediante las secuencias del dominio transmembrana de CTLA-4 y PD-1 descritas en la presente memoria (es decir, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11), los dominios transmembrana descritos en la presente memoria, en algunas realizaciones, comprenden uno o más aminoácidos del dominio extracelular y/o uno o más aminoácidos del dominio intracelular de la proteína de la que derivan (es decir, CTLA-4 o PD-1). En algunas realizaciones, los dominios transmembrana descritos en la presente memoria comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos del dominio extracelular de la proteína de la que derivan (es decir, CTLA-4 o PD-1). En algunas realizaciones, los dominios transmembrana descritos en la presente memoria comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos del dominio intracelular de la proteína de la que derivan (es decir, CTLA-4 o PD-1). En algunas realizaciones, los dominios transmembrana descritos en la presente memoria comprenden (i) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos del dominio extracelular de la proteína de la que derivan (es decir, CTLA-4 o PD-1), y (ii) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos del dominio intracelular de la proteína de la que derivan (es decir, CTLA-4 o PD-1).

En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un polipéptido que comprende un dominio transmembrana, en donde el dominio transmembrana es o comprende al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 aminoácidos consecutivos descritos en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un polipéptido que comprende un dominio transmembrana, en donde el dominio transmembrana es al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95%, idéntico a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. En otra realización específica, los polipéptidos proporcionados en la presente memoria comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 mutaciones amino, p. ej., mutaciones de aminoácidos conservadoras (p. ej., aminoácido hidrófobo mutado a un aminoácido hidrófobo diferente), en el dominio transmembrana del polipéptido.

También se describe en la presente memoria una secuencia de nucleótidos que codifica uno de los polipéptidos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se describe en la presente memoria una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. En otro ejemplo, se describe en la presente memoria un ácido nucleico que codifica un polipéptido descrito en la presente memoria, en donde el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 aminoácidos consecutivos descritos en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. En otro ejemplo, se describe en la presente memoria una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que es al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95%, idéntico a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11.

En algunas realizaciones, el dominio extracelular de cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente memoria comprende un receptor, o una parte de un receptor, que se une a un antígeno en una célula tumoral. El dominio extracelular puede ser, p. ej., un receptor o una parte de un receptor, que se une a dicho antígeno. En algunas

realizaciones, el dominio extracelular comprende, o es, un anticuerpo o una parte del mismo que se une al antígeno. En una realización específica, el dominio extracelular comprende, o es, un dominio de Fv monocatenario. El dominio de Fv monocatenario puede comprender, por ejemplo, un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno.

El antígeno al que se une el dominio extracelular del polipéptido es un antígeno en una célula tumoral. La célula tumoral puede ser, p. ej., una célula en un tumor sólido, o una célula de tumor no sólido, p. ej., una célula de un cáncer de la sangre. En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor. En una realización específica, el antígeno asociado a tumor o antígeno específico de tumor es, sin limitación, Her2, antígeno de citoblastos prostáticos (PSCA), alfa-fetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer-125 (CA-125), CA19-9, calretinina, MUC-1, proteína de membrana epitelial (EMA), antígeno tumoral epitelial (ETA), tirosinasa, antígeno asociado a melanoma (MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del fluido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, proteína melan-A (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T; MART-1), myo-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo-1, la forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (tumor M2-PK), CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante del factor de crecimiento epidérmico III), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteina, TARP (proteína de marco de lectura alternativo de receptor de células T gamma), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembranales de la próstata 1), una proteína Ras anormal, o una proteína p53 anormal. En otra realización específica, dicho antígeno asociado a tumor o antígeno específico de tumor es integrina αvβ3 (CD61), galactina, K-Ras (oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2), o Ral-B.

En algunas realizaciones, el dominio extracelular de los polipéptidos descritos en la presente memoria se une al dominio transmembrana del polipéptido por un conector, espaciador o secuencia de polipéptido/peptídica bisagra, p. ej., una secuencia bisagra de CH2CH3 o una secuencia de CD8, CD28, CTLA4 o PD-1.

El dominio intracelular de los polipéptidos descritos en la presente memoria es o comprende un dominio intracelular de una proteína que es expresada en la superficie de células T y produce la activación y/o proliferación de dichas células T. De acuerdo con la invención, el dominio intracelular es un dominio de señalización intracelular de CD3ζ. En otro ejemplo, el dominio intracelular es de una cadena de receptor de linfocito, una proteína de complejo TCR/CD3, una subunidad del receptor Fc o una subunidad del receptor de IL-2.

En algunas realizaciones, los polipéptidos proporcionados en la presente memoria comprenden adicionalmente uno o más dominios coestimuladores, p. ej., como parte del dominio intracelular de los polipéptidos. El uno o más dominios coestimuladores pueden ser, o pueden comprender, sin limitación, uno o más de una secuencia de una secuencia de polipéptido CD27 coestimulador, una secuencia de polipéptido CD28 coestimulador, una secuencia de polipéptido OX40 (CD134) coestimulador, una secuencia de polipéptido 4-1BB (CD137) coestimulador, o una secuencia de polipéptido de coestimulador inducible (ICOS) de células T coestimulador.

En una realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de unión al antígeno (p. ej., un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno de una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes); (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28 o CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1; (iv) un dominio coestimulador; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ. En una realización específica, el dominio de unión al antígeno del polipéptido se une a CD19.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de unión al antígeno (p. ej., un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno de una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes); (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CH2CH3; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de unión al antígeno (p. ej., un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno de una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes); (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1; (iv) un dominio coestimulador de 4-1BB; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno de interés (p. ej., un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes); (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno de interés (p. ej., un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes); (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno de interés (p. ej., un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes); (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno de interés (p. ej., un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes); (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de unión al antígeno (p. ej., un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes); (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de PD-1; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1; (iv) un dominio coestimulador; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de PD-1; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de PD-1; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otro aspecto, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T, p. ej., células T, que comprenden, p. ej., que expresan en su superficie celular, un polipéptido unido a membrana, en donde dicho polipéptido comprende (i) un dominio transmembrana que comprende el dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1, (ii) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ que produce la activación y/o proliferación de linfocitos, y (iii) un dominio extracelular que se une a un antígeno en una célula tumoral, en donde si el dominio transmembrana es de CTLA4, el dominio extracelular (opcionalmente excluyendo un conector de CTLA4) de dicho polipéptido no es de CTLA4; y si el dominio transmembrana es de PD-1, el dominio extracelular de dicho polipéptido no es de PD-1, en donde el polipéptido es un receptor de antígeno quimérico (CAR).

En una realización específica, se proporciona en la presente memoria un linfocito T que comprende un polipéptido que comprende un dominio transmembrana de CTLA4, en donde el dominio transmembrana de CTLA4 es la secuencia de polipéptido codificada por el exón 3 de un gen *CTLA4* humano (p. ej., nº de acceso en GenBank NM_005214.4 (CTLA4 proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico (*Homo sapiens*); ID de gen: 1493)).

En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un linfocito T que comprende un polipéptido que comprende un dominio transmembrana de CTLA4, en donde el dominio transmembrana de CTLA4 es o comprende la secuencia de aminoácidos PEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKM (en el código de tres letras, Pro-Glu-Pro-Cys-Pro-Asp-Ser-Asp-Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Ser-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Leu-Thr-Ala-Val-Ser-Leu-Ser-Lys-Met) (SEQ ID NO: 1).

En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un linfocito T que comprende un polipéptido que comprende un dominio transmembrana de CTLA4, en donde el dominio transmembrana de CTLA4 es o comprende la secuencia de polipéptido codificada por los nucleótidos 610-722 de nº de acceso en GenBank NM_005214.4 (CTLA4 proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico (*Homo sapiens*); ID de gen: 1493).

En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un linfocito T que comprende un polipéptido que comprende un dominio transmembrana de CTLA4, en donde el dominio transmembrana de CTLA4 es o comprende la secuencia de aminoácidos PDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSL (en el código de tres letras, Pro-

Asp-Ser-Asp-Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Ser-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Leu-Thr-Ala-Val-Ser-Leu) (SEQ ID NO: 2).

En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un linfocito T que comprende un polipéptido que comprende un dominio transmembrana de CTLA4, en donde el dominio transmembrana de CTLA4 es o comprende la secuencia de polipéptido codificada por los nucleótidos 636-699 de nº de acceso en GenBank NM_005214.4 (CTLA4 proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico (*Homo sapiens*); ID de gen: 1493).

En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un linfocito T que comprende un polipéptido que comprende un dominio transmembrana de CTLA4, en donde el dominio transmembrana de CTLA4 es o comprende la secuencia de aminoácidos FLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAV (en el código de tres letras, Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Ser-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Leu-Thr-Ala-Val) (SEQ ID NO: 3).

En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un linfocito T que comprende un polipéptido que comprende un dominio transmembrana de CTLA4, en donde el dominio transmembrana de CTLA4 es o comprende la secuencia de polipéptido FLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (en el código de tres letras, Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Ser-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Leu-Thr) (SEQ ID NO: 4).

En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un linfocito T que comprende un polipéptido que comprende un dominio transmembrana de CTLA4, en donde el dominio transmembrana de CTLA4 es o comprende la secuencia de polipéptido FLLWILVAVSLGLFFYSFLVSAVSLS (en el código de tres letras, Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Val-Ala-Val-Ser-Leu-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Val-Ser-Ala-Val-Ser-Leu-Ser) (SEQ ID NO: 5).

En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un linfocito T que comprende un polipéptido que comprende un dominio transmembrana de CTLA4, en donde el dominio transmembrana de CTLA4 es o comprende la secuencia de polipéptido LGIGNGTQIYVIDPEPSPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKM (en el código de tres letras, Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met) (SEQ ID NO: 9).

En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un linfocito T que comprende un polipéptido que comprende un dominio transmembrana de CTLA4, en donde el dominio transmembrana de CTLA4 es o comprende la secuencia de polipéptido FLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKM (en el código de tres letras, Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met) (SEQ ID NO: 10).

En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un linfocito T que comprende un polipéptido que comprende un dominio transmembrana de PD-1, en donde el dominio transmembrana de PD-1 es o comprende la secuencia de aminoácidos TLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAA (en el código de tres letras, Thr-Leu-Val-Val-Gly-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Leu-Gly-Ser-Leu-Val-Leu-Leu-Val-Trp-Val-Leu-Ala-Val-Ile-Cys-Ser-Arg-Ala-Ala) (SEQ ID NO: 6).

En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un linfocito T que comprende un polipéptido que comprende un dominio transmembrana de PD-1, en donde el dominio transmembrana de PD-1 es o comprende la secuencia de aminoácidos VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI (en el código de tres letras, Val-Gly-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Leu-Gly-Ser-Leu-Val-Leu-Leu-Val-Trp-Val-Leu-Ala-Val-Ile) (SEQ ID NO: 7).

En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un linfocito T que comprende un polipéptido que comprende un dominio transmembrana de PD-1, en donde el dominio transmembrana de PD-1 es o comprende la secuencia de aminoácidos FQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI (en el código de tres letras, Phe-Glu-Thr-Leu-Val-Val-Gly-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Leu-Gly-Ser-Leu-Val-Leu-Leu-Val-Trp-Val-Leu-Ala-Val-Ile) (SEQ ID NO: 8).

En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un linfocito T que comprende un polipéptido que comprende un dominio transmembrana de PD-1, en donde el dominio transmembrana de PD-1 es o comprende la secuencia de aminoácidos FQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAA (en el código de tres letras, Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala) (SEQ ID NO: 11).

También se describe en la presente memoria una secuencia de nucleótidos expresada o codificada por un linfocito T (es decir, un linfocito T que comprende un polipéptido descrito en la presente memoria) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11.

En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un linfocito T que comprende un polipéptido que comprende un dominio transmembrana, en donde el dominio transmembrana es o comprende al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 aminoácidos consecutivos descritos en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ

ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, se proporciona en la presente memoria un linfocito T que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido descrito en la presente memoria, en donde el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 aminoácidos consecutivos descritos en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11.

En algunas realizaciones, el dominio extracelular de un polipéptido expresado por los linfocitos T proporcionados en la presente memoria, comprende un receptor, o una parte de un receptor, que se une a un antígeno en una célula tumoral. El dominio extracelular puede ser, p. ej., un receptor o una parte de un receptor, que se une a dicho antígeno. En algunas realizaciones, el dominio extracelular comprende, o es, un anticuerpo o una parte del mismo que se une al antígeno. En realizaciones específicas, el dominio extracelular comprende, o es, un dominio de Fv monocatenario. El dominio de Fv monocatenario puede comprender, por ejemplo, un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno.

El antígeno al que se une el dominio extracelular del polipéptido expresado por un linfocito T proporcionado en la presente memoria, y por lo tanto al que el polipéptido dirige a la célula T, es un antígeno en una célula tumoral. La célula tumoral puede ser, p. ej., una célula en un tumor sólido, o una célula de un tumor no sólido, p. ej., una célula de un cáncer de la sangre. En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor. En algunas realizaciones, el antígeno es uno o más de Kappa, Lambda, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2, HER2, CEA, EGFRvIII, proteína espermática 17, PSCA, mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteina, TARP (proteína de marco de lectura alternativo de receptor de célula T gamma), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata 1), y/o MUC-1. En varias realizaciones específicas, sin limitación, el antígeno asociado a tumor o antígeno específico de tumor es Her2, antígeno de citoblastos prostáticos (PSCA), alfa-fetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer-125 (CA-125), CA19-9, calretinina, MUC-1, proteína de membrana epitelial (EMA), antígeno tumoral epitelial (ETA), tirosinasa, antígeno asociado a melanoma (MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del fluido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, proteína melan-A (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T; MART-1), myo-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo-1, la forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (tumor M2-PK), una proteína Ras anormal, o una proteína p53 anormal. En otra realización específica, dicho antígeno asociado a tumor o antígeno específico de tumor es integrina αvβ3 (CD61), galactina, K-Ras (oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2), o Ral-B.

En algunas realizaciones, el dominio extracelular de un polipéptido expresado por un linfocito T descrito en la presente memoria se une a dicho dominio transmembrana del polipéptido por un conector, espaciador o secuencia de polipéptido bisagra, p. ej., una secuencia de CD8, CD28, CTLA4 o PD-1.

En algunas realizaciones, el dominio intracelular de un polipéptido expresado por un linfocito T descrito en la presente memoria es o comprende un dominio intracelular de CD3ζ, una proteína que normalmente es expresada en la superficie de células T y que produce la activación y/o proliferación de dichas células T. Por lo tanto, el dominio intracelular es un dominio de señalización intracelular de CD3ζ. En otros casos, el dominio intracelular es de una cadena de receptor de linfocito, una proteína de complejo TCR/CD3, una subunidad del receptor Fc o una subunidad del receptor de IL-2.

En algunas realizaciones, un polipéptido expresado por un linfocito T descrito en la presente memoria comprende adicionalmente uno o más dominios coestimuladores, p. ej., como parte del dominio intracelular del polipéptido. El uno o más dominios coestimuladores pueden ser, o comprender, uno o más de una secuencia de polipéptido CD27 coestimulador, una secuencia de polipéptido CD28 coestimulador, una secuencia de polipéptido OX40 (CD134) coestimulador, una secuencia de polipéptido 4-1BB (CD137) coestimulador, o una secuencia de polipéptido de coestimulador inducible (ICOS) de células T coestimulador.

En una realización específica, los linfocitos T proporcionados en la presente memoria expresan o comprenden un polipéptido que comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de unión al antígeno (p. ej., un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno de una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes); (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28 o CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1; (iv) un dominio coestimulador; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ. En una realización específica, el dominio de unión al antígeno del polipéptido se une a CD19.

En una realización específica, los linfocitos T proporcionados en la presente memoria expresan o comprenden un polipéptido que comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de unión al antígeno (p. ej., un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno de una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes); (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CH2CH3; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ. En una realización específica, el dominio de unión al antígeno del polipéptido se une a HER2.

En una realización específica, los linfocitos T proporcionados en la presente memoria expresan o comprenden un polipéptido que comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de unión al antígeno (p. ej., un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno de una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes); (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CH2CH3; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ. En una realización específica, el dominio de unión al antígeno del polipéptido se une a HER2.

En otra realización específica, los linfocitos T proporcionados en la presente memoria expresan o comprenden un polipéptido que comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, los linfocitos T proporcionados en la presente memoria expresan o comprenden un polipéptido que comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, los linfocitos T proporcionados en la presente memoria expresan o comprenden un polipéptido que comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, los linfocitos T proporcionados en la presente memoria expresan o comprenden un polipéptido que comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno de interés (p. ej., un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, los linfocitos T proporcionados en la presente memoria expresan o comprenden un polipéptido que comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de unión al antígeno (p. ej., un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno de una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes); (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de PD-1; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1; (iv) un dominio coestimulador; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, los linfocitos T proporcionados en la presente memoria expresan o comprenden un polipéptido que comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de PD-1; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, los linfocitos T proporcionados en la presente memoria expresan o comprenden un polipéptido que comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de PD-1; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En una realización específica, los linfocitos T proporcionados en la presente memoria que expresan o comprenden uno o más de los polipéptidos proporcionados en la presente memoria, se vuelven activados o estimulados para proliferar cuando dicho polipéptido se une al antígeno para el que es específico el dominio de unión al antígeno o dominio de Fv monocatenario del polipéptido. En otra realización específica, los linfocitos T proporcionados en la presente memoria que expresan o comprenden uno o más de los polipéptidos proporcionados en la presente memoria, matan células que expresan o comprenden el antígeno para el que es específico el dominio de unión al antígeno o dominio de Fv monocatenario del polipéptido cuando los linfocitos T se ponen en contacto con dichas células que expresan el antígeno.

Se describen además en la presente memoria métodos de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o trastorno, en donde la enfermedad o trastorno se caracteriza, o se puede caracterizar, por células que expresan un

antígeno, que comprenden administrar al individuo uno o más de los linfocitos T proporcionados en la presente memoria, es decir, linfocitos T que comprenden o expresan un polipéptido descrito en la presente memoria.

**4. Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 representa la expresión de los CAR por células T tres días después de transducción de las células T con vectores lentivirales que expresan los CAR.

La figura 2 representa la producción de interleuquina-2 (IL-2) por CAR-células T (i) en el estado de reposo (primera barra), (ii) después de exposición a anti-CD28 (aCD28) (segunda barra); (iii) después de exposición a HER2-Fc 0,25 µg/ml; (iv) después de exposición a HER2-Fc 0,5 µg/ml; y (v) después de exposición a HER2-Fc 1,0 µg/ml.

La figura 3 representa la producción de GM-CSF por CAR-células T (i) en el estado de reposo (primera barra), (ii) después de exposición a anti-CD28 (aCD28) (segunda barra); (iii) después de exposición a HER2-Fc 0,25 µg/ml; (iv) después de exposición a HER2-Fc 0,5 µg/ml; y (v) después de exposición a HER2-Fc 1,0 µg/ml.

La figura 4 representa la producción de interferón-gamma (IFN-γ) por CAR-células T (i) en el estado de reposo (primera barra), (ii) después de exposición a anti-CD28 (aCD28) (segunda barra); (iii) después de exposición a HER2-Fc 0,25 µg/ml; (iv) después de exposición a HER2-Fc 0,5 µg/ml; y (v) después de exposición a HER2-Fc 1,0 µg/ml.

La figura 5 representa la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) intracelular por CAR-células T después de múltiples ciclos de exposición a HER2-Fc 1,0 µg/ml.

La figura 6 representa porcentajes de CAR-células T que expresan ciertos CAR anti-HER2 o un control de simulación en ausencia (paneles superiores) y presencia (paneles inferiores) de estimulación con HER2-Fc. A) Porcentajes de CAR-células T anti-HER2 que expresan simulado, HER2-28TMζ o HER2-28TM28ζ. B) Porcentajes de CAR-células T anti-HER2 que expresan HER2-CTLA4TM28ζ o HER2-4-1BBTM28ζ.

La figura 7 representa la expresión de CAR por células T once días después de transducción de las células T con vectores lentivirales que expresan los CAR.

La figura 8 representa la producción de IL-2, TNF-α e IFN-γ por células CAR-células T (i) en el estado de reposo, (ii) después de exposición a HER2-Fc 0,25, 0,5 o 1,0 µg/ml; o (iii) después de ligado de CD3/CD28. La primera barra (más a la izquierda) en cada grupo: células transducidas de forma simulada (CAR no expresado); segunda barra en cada grupo: células transducidas con CAR denominado HER-PD1TM-CD28-CD3; tercera barra en cada grupo: células transducidas con CAR denominado HER-CTLA4(189)TM-41BB-CD3; cuarta barra en cada grupo: células transducidas con CAR denominado HER-PD1TM-41BB-CD3; quinta barra (más a la derecha) en cada grupo: células transducidas con CAR denominado HER2-CD28TM-CD28-CD3.

La figura 9 representa la producción de GM-CSF, granzima B e IL-13 por CAR-células T (i) en el estado de reposo, (ii) después de exposición a HER2-Fc 0,25, 0,5 o 1,0 µg/ml; o (iii) después de ligado de CD3/CD28. La primera barra (más a la izquierda) en cada grupo: células transducidas de forma simulada (CAR no expresado); segunda barra en cada grupo: células transducidas con CAR denominado HER-PD1TM-CD28-CD3; tercera barra en cada grupo: células transducidas con CAR denominado HER-CTLA4(189)TM-41BB-CD3; cuarta barra en cada grupo: células transducidas con CAR denominado HER-PD1TM-41BB-CD3; quinta barra (más a la derecha) en cada grupo: células transducidas con CAR denominado HER2-CD28TM-CD28-CD3.

La figura 10 representa recuentos de células T vivas después de estimulación con HER2-Fc. La primera barra (más a la izquierda): células transducidas con CAR denominado HER2-CD28TM-CD28-CD3; segunda barra: células transducidas con CAR denominado HER-PD1TM-CD28-CD3; tercera barra: células transducidas con CAR denominado HER-CTLA4(189)TM-41BB-CD3; cuarta barra: células transducidas con CAR denominado HER-PD1TM-41BB-CD3; quinta barra (más a la derecha) células transducidas de forma simulada (CAR no expresado).

**5. Descripción detallada**

La presente invención proporciona un polipéptido que comprende (i) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1, (ii) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ, y (iii) un dominio extracelular que se une a un antígeno en una célula tumoral, en donde dicho polipéptido es un receptor de antígeno quimérico (CAR) y un linfocito T que expresa dicho polipéptido es activado o estimulado para proliferar cuando dicho polipéptido se une a dicho antígeno, y en donde si el dominio transmembrana es de CTLA4, el dominio extracelular de dicho polipéptido no es de CTLA4; y si el dominio transmembrana es de PD-1, el dominio extracelular de dicho polipéptido no es de PD-1.

En algunas realizaciones, cuando el polipéptido de la invención es expresado en la superficie de un linfocito T, dirige al linfocito T para matar una célula que expresa dicho antígeno. En otra realización del polipéptido de la invención, el dominio transmembrana de CTLA4 es la secuencia de polipéptido codificada por el exón 3 de un gen *CTLA4* humano. En otra realización del polipéptido de la invención, dicho dominio extracelular es un anticuerpo o una parte

del mismo de unión al antígeno. En otra realización del polipéptido de la invención, dicho antígeno es un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor.

En algunas realizaciones del polipéptido de la invención dicho antígeno asociado a tumor o antígeno específico de tumor es Her2, antígeno de citoblastos prostáticos (PSCA), alfa-fetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer-125 (CA-125), CA19-9, calretinina, MUC-1, proteína de membrana epitelial (EMA), antígeno tumoral epitelial (ETA), tirosinasa, antígeno asociado a melanoma (MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del fluido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, proteína melan-A (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T; MART-1), myo-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo-1, la forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (tumor M2-PK), CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante del factor de crecimiento epidérmico III), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteina, TARP (proteína de marco de lectura alternativo de receptor de células T gamma), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembranales de la próstata 1), una proteína Ras anormal, una proteína p53 anormal, integrina αvβ3 (CD61), galactina, K-Ras (oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2) o Ral-B.

En otra realización del polipéptido de la invención, dicho polipéptido comprende adicionalmente uno o más dominios coestimuladores. En algunas realizaciones dichos uno o más dominios coestimuladores comprenden uno o más de una secuencia de polipéptido CD27 coestimulador, una secuencia de polipéptido CD28 coestimulador, una secuencia de polipéptido OX40 (CD134) coestimulador, una secuencia de polipéptido 4-1BB (CD137) coestimulador, o una secuencia de polipéptido de coestimulador inducible (ICOS) de células T coestimulador.

En otra realización, dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de unión al antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28 o CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1; (iv) un dominio coestimulador; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización, dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización, dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización, dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización, dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización, dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de PD-1; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización, dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de PD-1; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un linfocito T que comprende el polipéptido de la invención.

En un aspecto, se proporcionan en la presente memoria polipéptidos que son receptores de antígenos quiméricos (véase, p. ej., Eshhar, patente de EE.UU. nº 7.741.465), que pueden ser expresados por linfocitos T (células T), están unidos a membrana en dichas células y que comprenden un dominio transmembrana de CTLA4 (antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico o proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico) o PD-1 (muerte celular programada 1). Se describen también en la presente memoria secuencias de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos descritos en la presente memoria. También se proporcionan en la presente memoria linfocitos T (p. ej., células T), que expresan dichos polipéptidos.

Los polipéptidos proporcionados en la presente memoria comprenden un dominio extracelular que se une a un antígeno en un tumor, un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1 y un dominio de señalización intracelular (citoplasmático) de CD3ζ que transmite una señal de activación primaria a una célula inmunitaria. Cuando los polipéptidos proporcionados en la presente memoria son expresados sobre la superficie de un linfocito T, y cuando el dominio extracelular del CAR se une a dicho antígeno, el dominio de señalización intracelular transmite una señal al linfocito T para activarse y/o proliferar, y, si el antígeno está presente en una superficie celular, para matar a la célula que expresa el antígeno. Debido a que los linfocitos T requieren dos señales con el fin de activarse completamente, una señal de activación primaria y una señal coestimuladora, en algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden comprender un dominio coestimulador de modo que la unión del antígeno al dominio extracelular de como resultado la transmisión tanto de una señal de activación primaria como de una señal coestimuladora.

Los polipéptidos, es decir, los CAR, proporcionados en la presente memoria son polipéptidos inmunoestimuladores, funcionales, que comprenden un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1. En un aspecto, se proporciona en la presente memoria un polipéptido que comprende (i) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1, (ii) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ (es decir dominio citoplasmático) que produce la activación y/o proliferación de linfocitos, y (iii) un dominio extracelular que se une a un antígeno en una célula tumoral, en donde si el dominio transmembrana es de CTLA4, el dominio extracelular de dicho polipéptido no es de CTLA4; y si el dominio transmembrana es de PD-1, el dominio extracelular de dicho polipéptido no es de PD-1. En una realización específica, un linfocito T que expresa un polipéptido descrito en la presente memoria es activado o estimulado para proliferar cuando dicho polipéptido se une a dicho antígeno para el que el polipéptido es específico (es decir, un antígeno que se une por el dominio extracelular del polipéptido). En una realización específica, el polipéptido, cuando es expresado en la superficie de un linfocito T, dirige al linfocito T a matar a una célula que expresa dicho antígeno.

En algunas realizaciones los polipéptidos proporcionados en la presente memoria comprenden un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1, en donde el dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1 es de un CTLA4 o PD-1 de mamífero, p. ej., ser humano, primate o roedor, p. ej., CTLA4 o PD-1 murino. En una realización específica, el dominio transmembrana no comprende aminoácidos del dominio intracelular, dominio extracelular o cualquier del dominio intracelular o extracelular de CTLA4 o PD-1. Se proporcionan a continuación ejemplos específicos no limitantes de secuencias del dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1.

En una realización específica, se proporciona en la presente memoria un polipéptido que comprende un dominio transmembrana de CTLA4, en donde el dominio transmembrana de CTLA4 es la secuencia de polipéptido codificada por el exón 3 de un gen *ctla4* humano (p. ej., nº de acceso en GenBank NM_005214.4 (CTLA4 proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico (*Homo sapiens*); ID de gen: 1493)).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de aminoácidos PEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKM (en el código de tres letras, Pro-Glu-Pro-Cys-Pro-Asp-Ser-Asp-Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Ser-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Leu-Thr-Ala-Val-Ser-Leu-Ser-Lys-Met) (SEQ ID NO: 1).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de polipéptido codificada por los nucleótidos 610-722 de nº de acceso en GenBank NM_005214.4 (CTLA4 proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico (*Homo sapiens*); ID de gen: 1493).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de aminoácidos PDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSL (en el código de tres letras, Pro-Asp-Ser-Asp-Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Ser-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Leu-Thr-Ala-Val-Ser-Leu) (SEQ ID NO: 2).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de polipéptido codificada por los nucleótidos 636-699 de nº de acceso en GenBank NM_005214.4 (CTLA4 proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico (*Homo sapiens*); ID de gen: 1493).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de aminoácidos FLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAV (en el código de tres letras, Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Ser-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Leu-Thr-Ala-Val) (SEQ ID NO: 3)

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de polipéptido FLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (en el código de tres letras, Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Ser-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Leu-Thr) (SEQ ID NO: 4).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de polipéptido FLLWILVAVSLGLFFYSFLVSAVSLS (en el código de tres letras, Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Val-Ala-Val-Ser-Leu-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Val-Ser-Ala-Val-Ser-Leu-Ser) (SEQ ID NO: 5).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de polipéptido LGIGNGTQIYVIDPEPSPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKM (en el código de tres letras, Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met) (SEQ ID NO: 9).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de CTLA4 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de polipéptido FLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKM (en el código de tres letras, Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met) (SEQ ID NO: 10).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de PD-1 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de aminoácidos TLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAA (en el código de tres letras, Thr-Leu-Val-Val-Gly-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Leu-Gly-Ser-Leu-Val-Leu-Leu-Val-Trp-Val-Leu-Ala-Val-Ile-Cys-Ser-Arg-Ala-Ala) (SEQ ID NO: 6).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de PD-1 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de aminoácidos VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI (en el código de tres letras, Val-Gly-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Leu-Gly-Ser-Leu-Val-Leu-Leu-Val-Trp-Val-Leu-Ala-Val-Ile) (SEQ ID NO: 7).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de PD-1 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de aminoácidos FQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI (en el código de tres letras, Phe-Glu-Thr-Leu-Val-Val-Gly-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Leu-Gly-Ser-Leu-Val-Leu-Leu-Val-Trp-Val-Leu-Ala-Val-Ile) (SEQ ID NO: 8).

En otra realización específica, el dominio transmembrana de PD-1 de un polipéptido proporcionado en la presente memoria es o comprende la secuencia de aminoácidos FQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAA (en el código de tres letras, Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala) (SEQ ID NO: 11).

Como se ilustra mediante las secuencias del dominio transmembrana de CTLA-4 y PD-1 descritas en la presente memoria (es decir, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11), los dominios transmembrana descritos en la presente memoria, en algunas realizaciones, comprenden uno o más aminoácidos del dominio extracelular y/o uno o más aminoácidos del dominio intracelular de la proteína de la que derivan (es decir, CTLA-4 o PD-1). En algunas realizaciones, los dominios transmembrana descritos en la presente memoria comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos del dominio extracelular de la proteína de la que derivan (es decir, CTLA-4 o PD-1). En algunas realizaciones, los dominios transmembrana descritos en la presente memoria comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos del dominio intracelular de la proteína de la que derivan (es decir, CTLA-4 o PD-1). En algunas realizaciones, los dominios transmembrana descritos en la presente memoria comprenden (i) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos del dominio extracelular de la proteína de la que derivan (es decir, CTLA-4 o PD-1), y (ii) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos del dominio intracelular de la proteína de la que derivan (es decir, CTLA-4 o PD-1).

En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un polipéptido que comprende un dominio transmembrana, en donde el dominio transmembrana es o comprende al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 aminoácidos consecutivos descritos en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. En otra realización específica, se proporciona en la presente memoria un polipéptido que comprende un dominio transmembrana, en donde el dominio transmembrana es al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95%, idéntico a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11.

También se describe en la presente memoria una secuencia de nucleótidos que codifica uno de los polipéptidos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se describe en la presente memoria una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. Además, se describe en la presente memoria un ácido nucleico que codifica un polipéptido descrito en la presente memoria, en donde el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 aminoácidos consecutivos descritos en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. En otro ejemplo, se describe en la presente memoria una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que es al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95%, idéntico a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3,

SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11.

En la construcción de los polipéptidos proporcionados en la presente memoria, en algunas realizaciones, se pueden combinar secuencias humanas con secuencias no humanas. Por ejemplo, un polipéptido que comprende secuencias de aminoácidos del dominio extracelular e intracelular humanas puede comprender un dominio transmembrana de una especie no humana; p. ej., puede comprender un dominio transmembrana de CTLA4 murino o un dominio transmembrana de PD-1 murino. En una realización más específica, el polipéptido comprende secuencias de aminoácidos humanas para los dominios extracelular e intracelular, y comprende un dominio transmembrana que tiene, o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

Los dominios extracelulares de los polipéptidos proporcionados en la presente memoria se unen a un antígeno en una célula tumoral. En algunas realizaciones, el dominio extracelular de un polipéptido proporcionado en la presente memoria, comprende un receptor, o una parte de un receptor, que se une a dicho antígeno. El dominio extracelular puede ser, p. ej., un receptor o una parte de un receptor, que se une a dicho antígeno. En algunas realizaciones, el dominio extracelular comprende, o es, un anticuerpo o una parte del mismo que se une al antígeno. En realizaciones específicas, el dominio extracelular comprende, o es, un dominio de Fv monocatenario. El dominio de Fv monocatenario puede comprender, por ejemplo, un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno.

El antígeno al que se une/reconoce el dominio extracelular de los polipéptidos proporcionados en la presente memoria es un antígeno en una célula tumoral. La célula tumoral puede ser, p. ej., una célula en un tumor sólido, o célula de un tumor no sólido, p. ej., una célula de un cáncer de la sangre. El antígeno puede ser cualquier antígeno que es expresado en una célula de cualquier tipo de tumor o cáncer, p. ej., células de un linfoma, un cáncer de pulmón, un cáncer de mama, un cáncer de próstata, un carcinoma adrenocortical, un carcinoma de tiroides, un carcinoma nasofaríngeo, un melanoma, p. ej., un melanoma maligno, un carcinoma de piel, un carcinoma colorrectal, un tumor desmoide, un tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, un tumor endocrino, un sarcoma de Ewing, un tumor neuroectodérmico primitivo periférico, un tumor de células germinales sólidas, un hepatoblastoma, un neuroblastoma, un sarcoma de tejido blando no rabdomiosarcoma, un osteosarcoma, un retinoblastoma, un rabdomiosarcoma, un tumor de Wilms, un glioblastoma, un mixoma, un fibroma, un lipoma, o similares. En realizaciones más específicas, dicho linfoma puede ser leucemia linfocítica crónica (linfoma linfocítico pequeño), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma esplénico de la zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma de células B de la zona marginal extranodal, linfoma MALT, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de células B grandes (tímico) de mediastino, linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de efusión primaria, linfoma de Burkitt, leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica de linfocitos T grandes granulares, leucemia agresiva de células NK, leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto, linfoma de linfocitos T/NK extranodal, tipo nasal, linfoma de linfocitos T de tipo enteropatía, linfoma de linfocitos T hepatoesplénico, linfoma blástico de células NK, micosis fungoide, síndrome de Sezary, linfoma primario cutáneo anaplásico de células grandes, papulosis linfomatoide, linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T, linfoma de linfocitos T periférico (no especificado), linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de Hodgkin o un linfoma no Hodgkin. Los antígenos específicos de determinados cánceres, así como los métodos para identificar dichos antígenos, son conocidos en la técnica.

En una realización específica, en la que el cáncer es la leucemia linfocítica crónica (CLL), las células B de la CLL tienen un catiotipo normal. En otras realizaciones específicas, en las que el cáncer es la leucemia linfocítica crónica (CLL), las células B de la CLL llevan una eliminación 17p, una eliminación 11q, una trisomía 12q, una eliminación 13q o una eliminación p53.

En algunas realizaciones, el antígeno reconocido por el dominio extracelular del polipéptido descrito en la presente memoria es un antígeno asociado a tumor (TAA) o un antígeno específico de tumor (TSA). En diferentes realizaciones específicas, el antígeno asociado a tumor o antígeno específico de tumor es, sin limitación, Her2, antígeno de citoblastos prostáticos (PSCA), alfa-fetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer-125 (CA-125), CA19-9, calretinina, MUC-1, proteína de membrana epitelial (EMA), antígeno tumoral epitelial (ETA), tirosinasa, antígeno asociado a melanoma (MAGE), CD19, CD22, CD27, CD30, CD34, CD45, CD70, CD99, CD117, EGFRvIII (variante del factor de crecimiento epidérmico III), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteina, TARP (proteína de marco de lectura alternativo de receptor de células T gamma), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembranales de la próstata 1), cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del fluido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, proteína melan-A (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T; MART-1), myo-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo-1, la forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (tumor M2-PK), una proteína Ras anormal, o una proteína p53 anormal.

En algunas realizaciones, el TAA o TSA reconocido por el dominio extracelular de un polipéptido descrito en la presente memoria es integrina $\alpha v\beta 3$ (CD61), galactina o Ral-B.

En algunas realizaciones, el TAA o TSA reconocido por el dominio extracelular de un polipéptido descrito en la presente memoria es un antígeno de cáncer/testículo (CT), p. ej., BAGE, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-ESO-1, NY-SAR-35, OY-TES-1, SPANXB1, SPA17, SSX, SYCP1 o TPTE.

En algunas otras realizaciones, el TAA o TSA reconocido por el dominio extracelular de un polipéptido descrito en la presente memoria es un hidrato de carbono o un gangliósido, p. ej., fuc-GM1, GM2 (antígeno oncofetal-immunogénico-1; OFA-I-1); GD2 (OFA-I-2), GM3, GD3, y similares.

En algunas otras realizaciones, el TAA o TSA reconocido por el dominio extracelular de un polipéptido descrito en la presente memoria es alfa-actinina-4, Bage-1, BCR-ABL, proteína de fusión Bcr-Abl, beta-catenina, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, Casp-8, cdc27, cdk4, cdkn2a, CEA, coa-1, proteína de fusión dek-can, EBNA, EF2, antígenos del virus de Epstein-Barr, proteína de fusión ETV6-AML1, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAAO205, Mart2, Mum-1, 2 y 3, neo-PAP, miosina clase I, OS-9, proteína de fusión pml-RARα, PTPRK, K-ras, N-ras, triosefosfato isomerasa, Gage 3,4,5,6,7, GnTV, Herv-K-mel, Lage-1, NA-88, NY-Eso-1/Lage-2, SP17, SSX-2, TRP2-Int2, , gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, RAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15(58), RAGE, SCP-1, Hom/Mel-40, PRAME, p53, H-Ras, HER-2/neu, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos del papilomavirus humano (HPV) E6 y E7, TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, 13-Catenin, Mum-1, p16, TAGE, PSMA, CT7, telomerasa, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, , CD68\KP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB\70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TAG72, TLP o TPS. Otros antígenos asociados a tumor o específicos de tumor son conocidos en la técnica.

Los anticuerpos, y scFv, que se unen a los TSA y TAA son conocidos en la técnica, así como lo son las secuencias de nucleótidos que los codifican.

En algunas realizaciones específicas, el antígeno reconocido por el dominio extracelular de un polipéptido descrito en la presente memoria es un antígeno que no se considera que sea un TSA o TAA, pero que no obstante está asociado con células tumorales, o daño causado por un tumor. En algunas realizaciones, por ejemplo, el antígeno es, p. ej., un factor de crecimiento, citoquina o interleuquina, p. ej., un factor de crecimiento, citoquina o interleuquina asociados con angiogénesis o vasculogénesis. Dichos factores de crecimiento, citoquinas o interleuquinas pueden incluir, p. ej., factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a insulina (IGF), o interleuquina-8 (IL-8). Los tumores también pueden crear un entorno hipóxico local en el tumor. Así pues, en otras realizaciones específicas, el antígeno es un factor asociado a hipoxia, p. ej., HIF-1α, HIF-1β, HIF-2α, HIF-2β, HIF-3α o HIF-3β. Los tumores también pueden causar daño localizado al tejido normal, causando la liberación de moléculas conocidas como moléculas de patrón molecular asociado al daño (DAMP; también conocidas como alarminas). Por lo tanto, en algunas otras realizaciones específicas, el antígeno es DAMP, p. ej., una proteína de choque térmico, caja del grupo 1 de proteínas de alta movilidad asociadas a cromatina (HMGB1), S100A8 (MRP8, calgranulina A), S100A9 (MRP14, calgranulina B), amiloide sérico A (SAA), o puede ser un ácido desoxirribonucleico, trifosfato de adenosina, ácido úrico, o sulfato de heparina.

En algunas realizaciones, el dominio extracelular del polipéptido descrito en la presente memoria se une al dominio transmembrana del polipéptido por un conector, espaciador o secuencia de polipéptido bisagra, p. ej., una secuencia de CD28 o una secuencia de CTLA4.

El dominio intracelular de un polipéptido descrito en la presente memoria es o comprende un dominio o motivo intracelular de una proteína que es expresada en la superficie de células T y produce la activación y/o proliferación de dichas células T. Dicho dominio o motivo es capaz de transmitir una señal de unión al antígeno primaria que es necesaria para la activación de un linfocito T en respuesta a la unión del antígeno a la parte extracelular del CAR. Típicamente, este dominio o motivo comprende, o es, un ITAM (motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina). Los polipéptidos que contienen ITAM adecuados para los CAR incluyen, por ejemplo, la cadena de CD3 zeta CD3ζ o sus partes que contienen ITAM. De acuerdo con la invención, el dominio intracelular es un dominio de señalización intracelular de CD3ζ. En otros casos, el dominio intracelular es de una cadena de receptor de linfocito, una proteína de complejo TCR/CD3, una subunidad del receptor Fc o una subunidad del receptor de IL-2.

En algunas realizaciones, los polipéptidos proporcionados en la presente memoria comprenden adicionalmente uno o más dominios o motivos coestimuladores, p. ej., como parte del dominio intracelular de los polipéptidos. El uno o más dominios o motivos coestimuladores pueden ser, o comprender, uno o más de una secuencia de polipéptido CD27 coestimulador, una secuencia de polipéptido CD28 coestimulador, una secuencia de polipéptido OX40 (CD134) coestimulador, una secuencia de polipéptido 4-1BB (CD137) coestimulador, o una secuencia de polipéptido de coestimulador inducible (ICOS) de células T coestimulador, u otro dominio o motivo coestimulador.

En una realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de unión al antígeno (p. ej., un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno de una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes); (ii) una secuencia de

polipéptido bisagra de CD28 o CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1; (iv) un dominio coestimulador; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de unión al antígeno (p. ej., un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno de una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes); (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CH2CH3; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de unión al antígeno (p. ej., un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno de una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes); (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1; (iv) un dominio coestimulador de 4-1BB; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de unión al antígeno (p. ej., un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes); (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de PD-1; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1; (iv) un dominio coestimulador; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de unión al antígeno (p. ej., un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes); (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de PD-1; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1; (iv) un dominio coestimulador; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de PD-1; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en

donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de PD-1; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, un polipéptido proporcionado en la presente memoria comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de 4-1BB; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, el polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de 4-1BB; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, el polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de 4-1BB; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

En otra realización específica, el polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector, en donde dicho $V_L$ y $V_H$ son de un antígeno en una célula tumoral, p. ej., un antígeno en una célula tumoral descrita antes; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de PD-1; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de 4-1BB; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

5.1. Polipéptidos aislados (receptores de antígenos quiméricos)

Los polipéptidos estimuladores de linfocitos T proporcionados en la presente memoria, que comprenden un dominio transmembrana CTLA4 o PD-1, se puede modificar, p. ej., por acilación, amidación, glicosilación, metilación, fosforilación, sulfatación, sumoilación, ubiquitilación, o similares. Los polipéptidos se pueden marcar con un marcador capaz de proporcionar una señal detectable, p. ej., con radioisótopos y compuestos fluorescentes. Una o más cadenas laterales del primer o segundo polipéptidos se pueden derivatizar, p. ej., derivatización de restos terminales lisinilo y amino con anhídrido succínico u otros anhídridos de ácidos carboxílicos, o derivatización con, p. ej., imidoésteres tales como metil-picolinimidato; piridoxal-fosfato; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobencenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanediona; y reacción con glioxilato catalizada por transaminasa. Los grupos laterales carboxilo, aspartilo o glutamilo, se pueden modificar selectivamente por reacción con carbodiimidas (R-N=C=N-R') tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida.

5.2. Ácidos nucleicos aislados

Se describen en la presente memoria secuencias de ácidos nucleicos (polinucleótidos) que codifican uno o más de los polipéptidos proporcionados en la presente memoria. Los polinucleótidos pueden estar contenidos dentro de cualquier vector polinucleótido adecuado para la transformación de células inmunitarias, p. ej., linfocitos T. Por ejemplo, los linfocitos T se pueden transformar usando vectores sintéticos, vectores lentivirales o retrovirales, plásmidos de replicación autónoma, un virus (p. ej., un retrovirus, lentivirus, adenovirus o virus del herpes), o similares, que contienen polinucleótidos que codifican el primer y segundo polipéptidos (p. ej., receptores quiméricos). Los vectores lentivirales adecuados para la transformación de linfocitos T incluyen, pero no se limitan a, p. ej., los vectores lentivirales descritos en las patentes de EE.UU. nº 5.994.136; 6.165.782; 6.428.953; 7.083.981; y 7.250.299. Los vectores de VIH adecuados para la transformación de linfocitos T incluyen, pero no se limitan a, p. ej., los vectores descritos en la patente de EE.UU. nº 5.665.577.

Los ácidos nucleicos útiles en la producción del primer y segundo polipéptidos, p. ej., dentro de un linfocito T modificado, incluyen ADN, ARN o análogos de ácidos nucleicos. Los análogos de ácidos nucleicos se pueden modificar en el resto de base, el resto de azúcar, o cadena principal de fosfato, y pueden incluir sustitución de desoxitimidina por desoxiuridina, sustitución de desoxicitidina por 5-metil-2'-desoxicitidina o 5-bromo-2'-desoxicitidina. Las modificaciones del resto de azúcar pueden incluir modificación del 2'-hidroxilo del azúcar ribosa para formar 2'-O-metil- o 2'-O-alil-azúcares. La cadena principal de fosfato de la desoxirribosa se puede modificar para producir ácidos nucleicos de morfolino, en los que cada resto de base está unido a un anillo de morfolino de seis miembros, o ácidos nucleicos peptídicos, en los que la cadena principal de desoxifosfato se sustituye por una cadena principal de pseudopéptido y se retienen las cuatro bases. Véase, por ejemplo, Summerton y Weller (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:187-195; y Hyrup et al. (1996) *Bioorgan. Med. Chain.* 4:5-23. Además, la cadena

principal de desoxifosfato se puede sustituir, por ejemplo, por una cadena principal de fosforotioato o fosforoditioato, una fosforoamidita, o un alquil-fosfotriéster.

5.3. Linfocitos T

Se proporcionan en la presente memoria linfocitos T, que comprenden los polipéptidos proporcionados en la presente memoria. Los linfocitos T proporcionados en la presente memoria pueden ser linfocitos T *naïve* o linfocitos T restringidos por MHC. En algunas realizaciones, los linfocitos T proporcionados en la presente memoria son linfocitos infiltrantes de tumor (TIL). En algunas realizaciones, los linfocitos T proporcionados en la presente memoria se han aislado de una biopsia de tumor, o se han expandido a partir de linfocitos T aislados de una biopsia de tumor. En algunas otras realizaciones, los linfocitos T proporcionados en la presente memoria se han aislado de, o se han expandido a partir de, linfocitos T expandidos a partir de sangre periférica, sangre de cordón umbilical o linfa.

En algunas realizaciones, los linfocitos T proporcionados en la presente memoria que comprenden un polipéptido proporcionado en la presente memoria, es decir, linfocitos T modificados, son autólogos respecto a un individuo al que se le van a administrar los linfocitos T modificados. En algunas realizaciones, los linfocitos T modificados proporcionados en la presente memoria son alogénicos respecto a un individuo al que se le van a administrar los linfocitos T modificados. Cuando se usan linfocitos T alogénicos para preparar linfocitos T modificados, los linfocitos T se pueden seleccionar de modo que reduzcan la posibilidad de enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) en el individuo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se pueden seleccionar linfocitos T específicos de virus para preparar linfocitos T modificados; se espera que dichos linfocitos tengan una capacidad nativa muy reducida de unirse a, y por lo tanto de ser activados por cualquiera de los antígenos del receptor. En algunas realizaciones, el rechazo mediado por el receptor de los linfocitos T alogénicos se puede reducir por coadministración al hospedante de uno o más agente inmunosupresores, p. ej., ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, ciclofosfamida, o similares.

En una realización, los linfocitos T se obtienen de un individuo, opcionalmente se expanden, y después se transforman con un polinucleótido que codifica un polipéptido que contiene dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1 descrito en la presente memoria, y opcionalmente se expanden. En una realización, los linfocitos T se obtienen de un individuo, opcionalmente se expanden, y después se transforman con un polinucleótido que codifica un polipéptido que contiene dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1 descrito en la presente memoria, y opcionalmente se expanden al menos una vez más. Las células que contienen polinucleótidos se pueden seleccionar usando un marcador seleccionable.

En algunas realizaciones, los linfocitos T modificados descritos en la presente memoria expresan o comprenden proteínas TCR naturales, p. ej., TCR-α y TCR-β que son capaces de formar complejos de TCR naturales, además del polipéptido que contiene el dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1. En algunas otras realizaciones, cualquiera o ambos genes naturales que codifican TCR-α y TCR-β en los linfocitos T modificados son modificados para ser no funcionales, p. ej., se elimina una parte o todo, se inserta una mutación, etc.

En algunas realizaciones, los linfocitos T descritos en la presente memoria se aíslan de una lesión tumoral, p. ej., linfocitos infiltrantes de tumor; se espera que dichos linfocitos T sean específicos para el TSA o TAA.

En algunas realizaciones, los motivos de señalización del polipéptido que contiene el dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1, es decir, CAR, se pueden usar para promover la proliferación y expansión de los linfocitos T modificados descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los linfocitos T no modificados y los linfocitos T que comprenden un polipéptido que comprende un dominio de señalización de CD3ζ y un dominio coestimulador de CD28, se pueden expandir usando anticuerpos contra CD3 y CD28, p. ej., anticuerpos unidos a perlas o a la superficie de una placa de cultivo celular; véase, p. ej., las patentes de EE.UU. nº 5.948.893; 6.534.055; 6.352.694; 6.692.964; 6.887.466 y 6.905.681. En algunas realizaciones, el antígeno, al que se une el dominio extracelular del polipéptido que contiene el dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1, se puede usar para promover la expansión selectiva de linfocitos T que expresan el polipéptido. Por ejemplo, en una realización, en la que el antígeno es un TSA, los linfocitos T que comprenden el polipéptido cultivado en presencia del TSA, p. ej., una forma soluble del TSA, daban como resultado una mayor proliferación en comparación con el cultivo en ausencia del TSA.

En algunas realizaciones, los linfocitos T que comprenden un polipéptido que contiene el dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1 descritos en la presente memoria, se estimulan para proliferar usando un anticuerpo que se une a un dominio de señalización intracelular de CD3ζ en el polipéptido acoplado con el antígeno que puede estar unido por el dominio extracelular de unión al antígeno del polipéptido. Por ejemplo, en realizaciones en las que el dominio de señalización intracelular del polipéptido es CD3ζ y el antígeno que se une al polipéptido es un TSA, los linfocitos T que comprenden el polipéptido son estimulados para proliferar por cultivo de las células en presencia del TSA (p. ej., una forma soluble del TSA) en combinación con un anticuerpo que se une a CD3ζ.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, el antígeno y/o anticuerpo pueden existir libres en el medio en el que se cultivan los linfocitos T, o cualquiera o ambos pueden estar unidos a un soporte sólido, p. ej., superficie de plástico de cultivo tisular, perlas, o similares.

Los linfocitos T que comprenden un polipéptido que contiene el dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1 descritos en la presente memoria, pueden comprender opcionalmente un "gen suicida" o "interruptor de seguridad" que

permite matar a todos o sustancialmente todos los linfocitos T cuando se desee. Por ejemplo, los linfocitos T modificados descritos en la presente memoria, en algunas realizaciones, pueden comprender un gen de timidina quinasa de HSV (HSV-TK), que produce la muerte de los linfocitos T modificados tras contacto con ganciclovir. En otra realización, los linfocitos T modificados expresan o comprenden una caspasa inducible, p. ej., una caspasa inducible 9 (icaspasa9), p. ej., una proteína de fusión entre la caspasa 9 y la proteína de unión FK506 humana, que permite la dimerización usando una molécula farmacéutica pequeña específica. Véase, Straathof et al., *Blood* 105(11):4247-4254 (2005).

5.4. Métodos de uso de los linfocitos T modificados

Los linfocitos T modificados proporcionados en la presente memoria que comprenden un polipéptido que contiene el dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1, p. ej., CAR, se pueden usar para tratar a un individuo que tiene uno o más tipos de células a las que se desea dirigir los linfocitos T, p. ej., uno o más tipos de células para matar. En algunas realizaciones, las células que se van a matar son células de cáncer, p. ej., células tumorales. En algunas realizaciones, las células de cáncer son células de un tumor sólido. En algunas realizaciones, las células son células de un linfoma, un cáncer de pulmón, un cáncer de mama, un cáncer de próstata, un carcinoma adrenocortical, un carcinoma de tiroides, un carcinoma nasofaríngeo, un melanoma, p. ej., un melanoma maligno, un carcinoma de piel, un carcinoma colorrectal, un tumor desmoide, un tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, un tumor endocrino, un sarcoma de Ewing, un tumor neuroectodérmico primitivo periférico, un tumor de células germinales sólidas, un hepatoblastoma, un neuroblastoma, un sarcoma de tejido blando no rabdomiosarcoma, un osteosarcoma, un retinoblastoma, un rabdomiosarcoma, un tumor de Wilms, un glioblastoma, un mixoma, un fibroma, un lipoma, o similares. En realizaciones más específicas, dicho linfoma puede ser leucemia linfocítica crónica (linfoma linfocítico pequeño), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma esplénico de la zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma de células B de la zona marginal extranodal, linfoma MALT, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de células B grandes (tímico) de mediastino, linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de efusión primaria, linfoma de Burkitt, leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica de linfocitos T grandes granulares, leucemia agresiva de células NK, leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto, linfoma de linfocitos T/NK extranodal, tipo nasal, linfoma de linfocitos T de tipo enteropatía, linfoma de linfocitos T hepatoesplénico, linfoma blástico de células NK, micosis fungoide, síndrome de Sezary, linfoma primario cutáneo anaplásico de células grandes, papulosis linfomatoide, linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T, linfoma de linfocitos T periférico (no especificado), linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de Hodgkin o un linfoma no Hodgkin.

La eficacia de los linfocitos T modificados descritos en la presente memoria, después de administración a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno que se puede remediar mediante linfocitos T, p. ej., un individuo que tiene cáncer, se puede evaluar mediante uno o más criterios, específicos para le enfermedad o trastorno particular, conocidos para los expertos en la técnica, que son indicativos de la evolución de la enfermedad o trastorno. En general, la administración de los linfocitos T modificados descritos en la presente memoria a dicho individuo es eficaz cuando uno o más de dichos criterios se mueve de forma detectable, p. ej., significativamente, desde un valor o intervalo de estado patológico a, o hacia un valor o intervalo normal.

Los linfocitos T modificados descritos en la presente memoria se pueden formular en cualquier solución farmacéuticamente aceptable, preferiblemente una solución adecuada para suministrar células vivas, p. ej., solución salina (tal como solución de Ringer), gelatinas, hidratos de carbono (p. ej., lactosa, amilosa, almidón o similares), ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc. Dichas preparaciones preferiblemente se esterilizan antes de la adición de los linfocitos T modificados, y se pueden mezclar con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones y colorantes. Los vehículos farmacéuticos adecuados para usar en la formulación de los linfocitos T modificados son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento WO 96/05309.

Por ejemplo, los linfocitos T modificados descritos en la presente memoria se formulan en dosis individuales, en donde dichas dosis individuales comprenden al menos, como máximo, o aproximadamente $1\times10^4$, $5\times10^4$, $1\times10^5$, $5\times10^5$, $1\times10^6$, $5\times10^6$, $1\times10^7$, $5\times10^7$, $1\times10^8$, $5\times10^8$, $1\times10^9$, $5\times10^9$, $1\times10^{10}$, $5\times10^{10}$ o $1\times10^{11}$ linfocitos T modificados. Los linfocitos T modificados se pueden formular para administración intravenosa, intraarterial, parenteral, intramuscular, subcutánea, intratecal, o intraocular, o administración dentro de un órgano o tejido particular.

6. Ejemplos

6.1. Ejemplo 1: Tratamiento del linfoma de células B

Un individuo presenta leucemia linfocítica crónica de células B, un linfoma de células B. El análisis de las células B del individuo determina que las células B llevan una eliminación 17p. Se obtienen linfocitos T del individuo, se transfectan con un vector lentiviral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), y se expanden usando perlas recubiertas con CD3+CD28 hasta un número suficiente para la administración. El receptor quimérico comprende una región extracelular de unión al antígeno que se une a CD19; un dominio transmembrana de CTLA4; un dominio intracelular coestimulador de CD28; y un dominio

intracelular de CD3ζ. Se administran al individuo entre $10^9$ y $10^{10}$ de los linfocitos T en 200 ml de solución salina por infusión intravenosa a lo largo de 30 minutos. Se vigila al individuo durante dos semanas posteriormente para establecer una reducción de al menos 90% de células B CD19+ en la sangre del individuo.

6.2. Ejemplo 2: Tratamiento de un linfoma de células B

Un individuo presenta leucemia linfocítica crónica de células B, un linfoma de células B. El análisis de las células B del individuo determina que las células B llevan una eliminación 17p. Se obtienen aproximadamente $10^6$ linfocitos T del individuo, se transfectan con un vector lentiviral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR. El CAR comprende una región extracelular de unión al antígeno que se une a CD19; un dominio transmembrana de PD-1; un dominio intracelular coestimulador de CD28; y un dominio intracelular de CD3ζ. Las células T que expresan CAR se administran al individuo sin expansión previa de las células T. Se administran al individuo entre $10^5$ y $10^6$ de los linfocitos T en 200 ml de solución salina por infusión intravenosa a lo largo de 30 minutos. Se vigila al individuo durante dos semanas posteriormente para establecer una reducción de al menos 90% de células B CD19+ en la sangre del individuo.

6.3. Ejemplo 3: Tratamiento del linfoma de células B

Un individuo presenta leucemia linfocítica crónica de células B, un linfoma de células B. El análisis de las células B del individuo determina que las células B llevan una eliminación p53. Se obtienen linfocitos T del individuo, se transfectan con un vector lentiviral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR, y se expanden usando perlas recubiertas con CD3+CD28 hasta un número suficiente para la administración. El CAR comprende una región extracelular de unión al antígeno que se une a CD19; un dominio transmembrana de CTLA4; dominios intracelulares coestimuladores de cada uno de CD28, 4-1BB y OX40; y un dominio intracelular de CD3ζ. Se administran al individuo entre $10^9$ y $10^{10}$ de los linfocitos T en 200 ml de solución salina por infusión intravenosa a lo largo de 30 minutos. Se vigila al individuo durante dos semanas posteriormente para establecer una reducción de al menos 90% de células B CD19+ en la sangre del individuo.

6.4. Ejemplo 4: Tratamiento de un linfoma de células B

Un individuo presenta leucemia linfocítica crónica de células B, un linfoma de células B. El análisis de las células B del individuo determina que las células B llevan una eliminación p53. Se obtienen aproximadamente $10^6$ linfocitos T del individuo, se transfectan con un vector lentiviral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR. El CAR comprende una región extracelular de unión al antígeno que se une a CD19; un dominio transmembrana de PD-1; dominios intracelulares coestimuladores de cada uno de CD28, 4-1BB y OX40; y un dominio intracelular de CD3ζ. Las células T que expresan CAR se administran al individuo sin expansión previa de las células T. Se administran al individuo entre $10^5$ y $10^6$ de los linfocitos T en 200 ml de solución salina por infusión intravenosa a lo largo de 30 minutos. Se vigila al individuo durante dos semanas posteriormente para establecer una reducción de al menos 90% de células B CD19+ en la sangre del individuo.

6.5. Ejemplo 5: Tratamiento de cáncer de próstata

Un individuo presenta cáncer de próstata en estadio T2, sin extensión a ganglios linfáticos regionales u otros (N0, M0). Se determina que el grado histológico es G2. Se determina en conjunto que el individuo tiene cáncer de próstata en estadio II. Se administran al individuo entre $10^9$ y $10^{10}$ linfocitos T modificados que comprenden un CAR en 200 ml de solución salina por infusión intravenosa a lo largo de 30 minutos. El CAR comprende una región extracelular de unión al antígeno que se une a PSCA, un dominio transmembrana de CTLA4; un dominio intracelular coestimulador de CD28; y un dominio intracelular de CD3ζ. Se vuelve a evaluar en el individuo el estadio del cáncer de próstata y la extensión a los ganglios linfáticos, y se lleva a cabo la histología del tejido prostático obtenido por biopsia a los 30, 60 y 90 días después de administración.

6.6. Ejemplo 6: Tratamiento de cáncer de próstata

Un individuo presenta cáncer de próstata en estadio T2, sin extensión a ganglios linfáticos regionales u otros (N0, M0). Se determina que el grado histológico es G2. Se determina en conjunto que el individuo tiene cáncer de próstata en estadio II. Se administran al individuo entre $10^9$ y $10^{10}$ linfocitos T modificados que comprenden un CAR en 200 ml de solución salina por infusión intravenosa a lo largo de 30 minutos. El CAR comprende una región extracelular de unión al antígeno que se une a PSCA, un dominio transmembrana de PD-1; un dominio intracelular coestimulador de CD28; y un dominio intracelular de CD3ζ. Se vuelve a evaluar en el individuo el estadio del cáncer de próstata y la extensión a los ganglios linfáticos, y se lleva a cabo la histología del tejido prostático obtenido por biopsia a los 30, 60 y 90 días después de administración.

6.7. Ejemplo 7: Tratamiento de cáncer de próstata

Un individuo presenta cáncer de próstata en estadio T2, sin extensión a ganglios linfáticos regionales u otros (N0, M0). Se determina que el grado histológico es G2. Se determina en conjunto que el individuo tiene cáncer de próstata en estadio II. Se administran al individuo entre $10^9$ y $10^{10}$ linfocitos T modificados que comprenden un CAR en 200 ml de solución salina por infusión intravenosa a lo largo de 30 minutos. El CAR comprende una región

extracelular de unión al antígeno que se une a PSCA, un dominio transmembrana de CTLA-4; dominios intracelulares coestimuladores de cada uno de CD28, 4-1BB y OX40; y un dominio intracelular de CD3ζ. Se vuelve a evaluar en el individuo el estadio del cáncer de próstata y la extensión a los ganglios linfáticos, y se lleva a cabo la histología del tejido prostático obtenido por biopsia a los 30, 60 y 90 días después de administración.

6.8. Ejemplo 8: Tratamiento de cáncer de próstata

Un individuo presenta cáncer de próstata en estadio T2, sin extensión a ganglios linfáticos regionales u otros (N0, M0). Se determina que el grado histológico es G2. Se determina en conjunto que el individuo tiene cáncer de próstata en estadio II. Se administran al individuo entre $10^9$ y $10^{10}$ linfocitos T modificados que comprenden un CAR en 200 ml de solución salina por infusión intravenosa a lo largo de 30 minutos. El CAR comprende una región extracelular de unión al antígeno que se une a PSCA, un dominio transmembrana de PD-1; dominios intracelulares coestimuladores de cada uno de CD28, 4-1BB y OX40; y un dominio intracelular CD3ζ. Se vuelve a evaluar en el individuo el estadio del cáncer de próstata y la extensión a los ganglios linfáticos, y se lleva a cabo la histología del tejido prostático obtenido por biopsia a los 30, 60 y 90 días después de administración.

6.9. Ejemplo 9: CAR que comprenden un dominio transmembrana de CTLA-4 o PD-1

Este ejemplo demuestra que el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio transmembrana de CTLA-4 o PD-1 es funcional y activo en células T.

6.9.1 CAR que comprenden un dominio transmembrana de CTLA-4

Se generaron CAR que comprenden un dominio extracelular (scFV anti-HER2) que se une al antígeno HER2. Específicamente se generaron los siguientes CAR: (i) HER-28TMζ, que comprende un scFV anti-HER2 , un dominio transmembrana de CD28, y un dominio intracelular de CD3ζ; (ii) HER-28TM28ζ, que comprende un scFV anti-HER2, un dominio transmembrana de CD28, y un dominio intracelular de CD28-CD3ζ; (iii) HER2-CTLA4TM28ζ, que comprende un scFV anti-HER2, una bisagra de CH2CH3, un dominio transmembrana de CTLA-4 (SEQ ID NO: 10), y un dominio intracelular de CD28-CD3ζ; y (iv) HER2-41BBTM28ζ,que comprende un scFV anti-HER2, una bisagra de CD8, un dominio transmembrana de 4-1BB, y un dominio intracelular de CD28-CD3ζ.

Se evaluó la capacidad de las células T humanas para expresar los CAR descritos antes. Se aislaron células T Pan y células T Pan *naïve* de la capa leucocitaria de sangre de muestra de donante por selección negativa usando un kit II de aislamiento de Pan T humano y kit de aislamiento de Pan T *naïve* humano, respectivamente (Miltenyi, Cambridge, MA). Las células T aisladas se cultivaron en medio completo RPMI en presencia de IL-7 10 ng/ml durante 11 días, y después se transdujeron con lentivirus que expresan construcciones de CAR con MOI de 5.

Tres días después de transducción, se caracterizó el fenotipo de CAR-células T por tinción de las células con una proteína de fusión HER2-Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN), seguido de tinción con un anticuerpo de cabra anti-IgG-Fc humana policlonal conjugado con FITC o APC) (Jackson ImmunoRessearch, West Grove, PA). El mismo día, las células T se estimularon con la proteína de fusión HER2-Fc con un gradiente de concentraciones en el intervalo de 0,25 µg/ml a 1 µg/ml. Se recogió el líquido sobrenadante 48 horas después de estimulación para el análisis de matriz de perlas citométricas (CBA), para evaluar la producción de citoquinas por las células T, usando el conjunto CBA flex adaptado (BD Biosciences, San Jose, CA). Las células del cultivo después de separación del líquido sobrenadante, se tiñeron para medir los marcadores de superficie de activación de las células T CD69, 4-1BB, CD71, HLA-DR y CD25 usando conjugados de anticuerpos monoclonales anti-Ig humana con fluorocromo (BD Biosciences). Se llevaron a cabo análisis de citometría de flujo tanto para CBA como para los marcadores de superficie en una máquina de FACS Canto II y los datos se adquirieron con el software FACSDiva (BD Biosciences). Los datos de CBA se analizaron con el software FCAP Assay (Soft Flow Ltd., Pecs, Hungría). Los datos de flujo de marcadores de superficie se analizaron usando el software de citometría de flujo FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

Como se muestra en la figura 1, tres de los CAR generados, incluyendo el CAR que tenía un dominio transmembrana de CTLA-4, eran altamente expresados por las células T. Los marcadores de superficie de activación de células T CD69, 4-1BB y HLA-DR eran regulados por aumento tras el ligado del CAR, es decir, cuando las CAR-células T eran estimuladas con la proteína de fusión HER2-Fc. En cada caso, los niveles más altos se observaron en las CAR-células T que expresaban la construcción HER2-CTLA4TM28ζ.

Como se muestra en las figuras 2-4, dos de los cuatro conjuntos de CAR-células T demostraron producción de citoquinas en respuesta a la estimulación con HER2. Específicamente, las células T que expresaban CAR denominado HER2-28TM28ζ y las células T que expresaban CAR denominado HER2-CTLA4TM28ζ produjeron las citoquinas interleuquina-2 (IL-2) (figura 2), GM-CSF (figura 3), e interferón-gamma (IFN-γ) (figura 4) de una forma dependiente de la dosis en respuesta a la estimulación con HER2. Sorprendentemente, las células T que expresaban un CAR que comprendía un dominio transmembrana de una proteína que normalmente transmite una señal inhibidora a las células del sistema inmunitario (es decir, el dominio transmembrana de CTLA-4) producían un nivel mucho mayor de cada una de las citoquinas en comparación con células T que expresaban cada uno de los otros CAR, incluyendo las células T que expresaban el CAR denominado HER2-28TM28ζ. Véanse las figuras 2-4.

Se examinó además si la estimulación de células T que expresaban los CAR descritos antes, con HER2 induce la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) intracelular por las células T. Las CAR-células T se estimularon con HER2-Fc (1 μg/ml) durante 2 días en medio que contenía IL-2 (50 UI/ml). La estimulación con HER2 se llevó a cabo dos veces más, separada por siete días cada vez. Después de la tercera estimulación, se examinó el TNF-α intracelular por citometría de flujo. Como se muestra en la figura 5, las células T que expresaban el CAR denominado HER2-28TM28ζ, las células T que expresaban el CAR denominado HER2-CTLA4TM28ζ y las células T que expresaban el CAR denominado HER2-28TMζ, producían TNF-α, con la mayor cantidad de TNF-α producida por las células T que expresaban un CAR que comprendía un dominio transmembrana de una proteína que normalmente transmite una señal inhibidora a las células del sistema inmunitario (es decir, el dominio transmembrana de CTLA-4).

Finalmente, se determinó si la estimulación de las células T que expresaban los CAR descritos antes, con HER2 daba como resultado el enriquecimiento de poblaciones de CAR-células T. Las CAR-células T que expresaban los CAR descritos antes, se estimularon con la proteína de fusión HER2-Fc. Trece días después de estimulación con HER2, las CAR-células T se analizaron por citometría de flujo, como se ha descrito antes. Sorprendentemente, como se muestra en la figura 6, solo las CAR-células T que expresaban el CAR denominado HER2-CTLA4TM28ζ estaban enriquecidas después de la estimulación con HER2.

6.9.2 CAR que comprenden un dominio transmembrana de PD-1 o CTLA-4

Este ejemplo demuestra que el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio transmembrana de CTLA-4 o un dominio transmembrana de PD-1 es funcional y activo en células T.

Se generaron CAR que comprenden un dominio extracelular (scFV anti-HER2) que se une al antígeno HER2. Específicamente se generaron los siguientes CAR: (i) HER-PD1TM-CD28-CD3, que comprende un scFV anti-HER2, una bisagra de CH2CH3, un dominio transmembrana de PD-1 (SEQ ID NO: 11), y un dominio intracelular de CD28-CD3; (ii) HER-CTLA4(189)TM-41BB-CD3, que comprende un scFV anti-HER2, una bisagra de CD28, un dominio transmembrana de CTLA-4 (SEQ ID NO: 10), y un dominio intracelular de 4-1BB-CD3; (iii) HER-PD1TM-41BB-CD3, que comprende un scFV anti-HER2, una bisagra de CD28, un dominio transmembrana de PD-1 (SEQ ID NO: 11), y un dominio intracelular de 4-1BB-CD3; y (iv) HER2-CD28TM-CD28-CD3, que comprende un scFV anti-HER2, una bisagra de CD28, un dominio transmembrana de CD28 y un dominio intracelular de CD28-CD3.

Se aislaron células T Pan y células T Pan *naïve* de la capa leucocitaria de sangre de muestra de donante por selección negativa usando un kit II de aislamiento de Pan T humano y kit de aislamiento de Pan T *naïve* humano, respectivamente (Miltenyi, Cambridge, MA). Las células T aisladas se cultivaron en medio completo RPMI en presencia de IL-7 10 ng/ml durante 11 días, y después se transdujeron con lentivirus que expresan construcciones de CAR con MOI de 7.

Tres días después de transducción, se caracterizó el fenotipo de las CAR-células T por tinción de las células con una proteína de fusión HER2-Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN), seguido de tinción con un anticuerpo de cabra anti-IgG-Fc humana policlonal conjugado con FITC o APC) (Jackson ImmunoRessearch, West Grove, PA). El mismo día, las células T se estimularon con la proteína de fusión HER2-Fc con un gradiente de concentraciones en el intervalo de 0,25 μg/ml a 1 μg/ml. Se recogió el líquido sobrenadante 48 horas después de estimulación para el análisis de matriz de perlas citométricas (CBA), para evaluar la producción de citoquinas por las células T, usando el conjunto CBA flex adaptado (BD Biosciences, San Jose, CA). Las células del cultivo después de separación del líquido sobrenadante, se tiñeron para medir los marcadores de superficie de activación de las células T CD69, 4-1BB, CD71, HLA-DR y CD25 usando conjugados de anticuerpos monoclonales anti-Ig humana con fluorocromo (BD Biosciences). Se llevaron a cabo análisis de citometría de flujo tanto para CBA como para los marcadores de superficie en una máquina de FACS Canto II y los datos se adquirieron con el software FACSDiva (BD Biosciences). Los datos de CBA se analizaron con el software FCAP Assay (Soft Flow Ltd., Pecs, Hungría). Los datos de flujo de marcadores de superficie se analizaron usando el software de citometría de flujo FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

Como se muestra en la figura 7, cada uno de los CAR generado era altamente expresado por las células T. Cada uno de los marcadores de superficie de activación de células T CD69, CD71 y HLA-DR era regulado por aumento tras la estimulación de las CAR-células T descritas antes con HER2. En cada caso, los niveles observados de regulación por aumento eran más altos en las células T-CAR que expresaban CAR con un dominio transmembrana de PD-1 o de CTLA-4.

Como se muestra en las figuras 8-9, las CAR-células T demostraron producción de citoquinas en respuesta a la estimulación con HER2. Específicamente, las células T que expresaban los CAR descritos antes producían las citoquinas IL-2 (figura 8), TNF-α (figura 8), e IFN-γ (figura 8), GM-CSF (figura 9), granzima B (figura 9), e IL-13 (figura 9) de una forma dependiente de la dosis en respuesta a la estimulación con HER2. En cada caso, las células T que expresaban CAR que comprenden un dominio transmembrana de PD-1 o CTLA-4 presentaban los niveles más altos de producción de citoquinas, expresando las células T con el CAR denominado HER-PD1TM-CD28-CD3 de forma consistente los niveles más altos de cada citoquina (véanse las figuras 8 y 9).

Finalmente, se determinó si la estimulación de las células T que expresaban los CAR descritos antes, con HER2 daba como resultado el enriquecimiento de las poblaciones de CAR-células T. Las CAR-células T que expresaban los CAR descritos antes, se estimularon con la proteína de fusión HER2-Fc. Once días después de estimulación con HER2, las CAR-células T se analizaron por citometría de flujo, como se ha descrito antes. Como se muestra en la figura 10, las CAR-células T que expresaban el CAR denominado HER-PD1TM-CD28-CD3 estaban enriquecidas después de la estimulación con HER2, mostrando las células T que expresaban los otros CAR descritos niveles modestos de aumento de células vivas frente al número de células inicial.

6.9.3 Conclusión

En conclusión, se ha demostrado la generación de células T que expresan un CAR que comprende un dominio transmembrana de una proteína que normalmente transmite una señal inhibidora a las células del sistema inmunitario. Además, se ha mostrado que dichas CAR-células T tienen características sorprendentes. En particular, dichas células T (i) demuestran niveles elevados de producción de citoquinas en respuesta a la estimulación con el antígeno al que se dirige el dominio extracelular del CAR que expresan, en comparación con células T que expresan CAR que comprenden un dominio transmembrana de una proteína que normalmente transmite una señal estimuladora a células del sistema inmunitario; y (ii) se enriquecen cuando se cultivan en presencia del antígeno al que se dirige el dominio extracelular del CAR que expresan, mientras que las células T que expresan CAR que comprenden un dominio transmembrana de una proteína que normalmente transmite una señal estimuladora a células del sistema inmunitario no se enriquecen en la misma medida, cuando son estimuladas con el antígeno.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Anthrogenesis Corporation

<120> RECEPTORES DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS

<130> 12827-401-228

<140>
<141>

<150> 61/740,113
<151> 2012-12-20

<150> 61/779,925
<151> 2013-03-13

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 36
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido sintético - Dominio transmembrana CTLA4

<400> 1

```
Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala
1               5                   10                  15

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

Leu Ser Lys Met
        35
```

<210> 2
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido sintético - Dominio transmembrana CTLA4

<400> 2

```
Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly
1               5                   10                  15

Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu
            20                  25
```

<210> 3
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido sintético - Dominio transmembrana CTLA4

<400> 3

Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe Tyr
1 5 10 15

Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val
20

<210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido sintético - Dominio transmembrana CTLA4

<400> 4
Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe Tyr
1 5 10 15

Ser Phe Leu Leu Thr
20

<210> 5
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido sintético - Dominio transmembrana CTLA4

<400> 5

Phe Leu Leu Trp Ile Leu Val Ala Val Ser Leu Gly Leu Phe Phe Tyr
1 5 10 15

Ser Phe Leu Val Ser Ala Val Ser Leu Ser
20 25

<210> 6
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido sintético - Dominio transmembrana PD-1

<400> 6

Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu
1 5 10 15

Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala
20 25

<210> 7
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido sintético - Dominio transmembrana PD-1

<400> 7
Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp
1 5 10 15

Val Leu Ala Val Ile
20

<210> 8
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido sintético - Dominio transmembrana PD-1

<400> 8
Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser Leu
1 5 10 15

Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile
20 25

<210> 9
<211> 49
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido sintético - Dominio transmembrana CTLA4

<400> 9
Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro
1 5 10 15

Ser Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser
20 25 30

Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys

35 40 45

Met

<210> 10
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido sintético - Dominio transmembrana CTLA4

<400> 10
Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe Tyr
1 5 10 15

Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met
20 25

<210> 11
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido sintético - PD-1 transmembrane domain

<400> 11
Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser Leu
1 5 10 15

Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala
20 25 30

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido que comprende (i) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1, (ii) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ, y (iii) un dominio extracelular que se une a un antígeno en una célula tumoral, en donde dicho polipéptido es un receptor de antígeno quimérico (CAR) y un linfocito T que expresa dicho polipéptido es activado o estimulado para proliferar cuando dicho polipéptido se une a dicho antígeno, y en donde

si el dominio transmembrana es de CTLA4, el dominio extracelular de dicho polipéptido no es de CTLA4; y

si el dominio transmembrana es de PD-1, el dominio extracelular de dicho polipéptido no es de PD-1.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido, cuando es expresado en la superficie de un linfocito T, dirige al linfocito T a matar a una célula que expresa dicho antígeno.

3. El polipéptido de la reivindicación 1 o 2, en donde el dominio transmembrana de CTLA4 es la secuencia de polipéptido codificada por el exón 3 de un gen *CTLA4* humano.

4. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho dominio extracelular es un anticuerpo o una parte del mismo de unión al antígeno.

5. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho antígeno es un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor.

6. El polipéptido de la reivindicación 5, en donde dicho antígeno asociado a tumor o antígeno específico de tumor es Her2, antígeno de citoblastos prostáticos (PSCA), alfa-fetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer-125 (CA-125), CA19-9, calretinina, MUC-1, proteína de membrana epitelial (EMA), antígeno tumoral epitelial (ETA), tirosinasa, antígeno asociado a melanoma (MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del fluido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, proteína melan-A (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T; MART-1), myo-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo-1, la forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (tumor M2-PK), CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante del factor de crecimiento epidérmico III), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteina, TARP (proteína de marco de lectura alternativo de receptor de células T gamma), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembranales de la próstata 1), una proteína ras anormal, una proteína p53 anormal, integrina αvβ3 (CD61), galactina, K-Ras (oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2) o Ral-B.

7. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho polipéptido comprende adicionalmente uno o más dominios coestimuladores.

8. El polipéptido de la reivindicación 7, en donde dichos uno o más dominios coestimuladores comprenden uno o más de una secuencia de polipéptido CD27 coestimulador, una secuencia de polipéptido CD28 coestimulador, una secuencia de polipéptido OX40 (CD134) coestimulador, una secuencia de polipéptido 4-1BB (CD137) coestimulador, o una secuencia de polipéptido de coestimulador inducible (ICOS) de células T coestimulador.

9. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de unión al antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28 o CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4 o PD-1; (iv) un dominio coestimulador; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

10. El polipéptido de la reivindicación 9, en donde dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

11. El polipéptido de la reivindicación 9, en donde dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

12. El polipéptido de la reivindicación 9, en donde dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CD28; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

13. El polipéptido de la reivindicación 9, en donde dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de CTLA4; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

14. El polipéptido de la reivindicación 9, en donde dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de PD-1; (iii) un dominio transmembrana de CTLA4; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

15. El polipéptido de la reivindicación 9, en donde dicho polipéptido comprende, en orden, desde el extremo N al extremo C: (i) un dominio de Fv monocatenario que comprende un $V_L$ unido a $V_H$ por un conector flexible, en donde dichos $V_L$ y $V_H$ son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno; (ii) una secuencia de polipéptido bisagra de PD-1; (iii) un dominio transmembrana de PD-1; (iv) un dominio coestimulador de CD28; y (v) un dominio de señalización intracelular de CD3ζ.

16. Un linfocito T que comprende el polipéptido de la reivindicación 1.

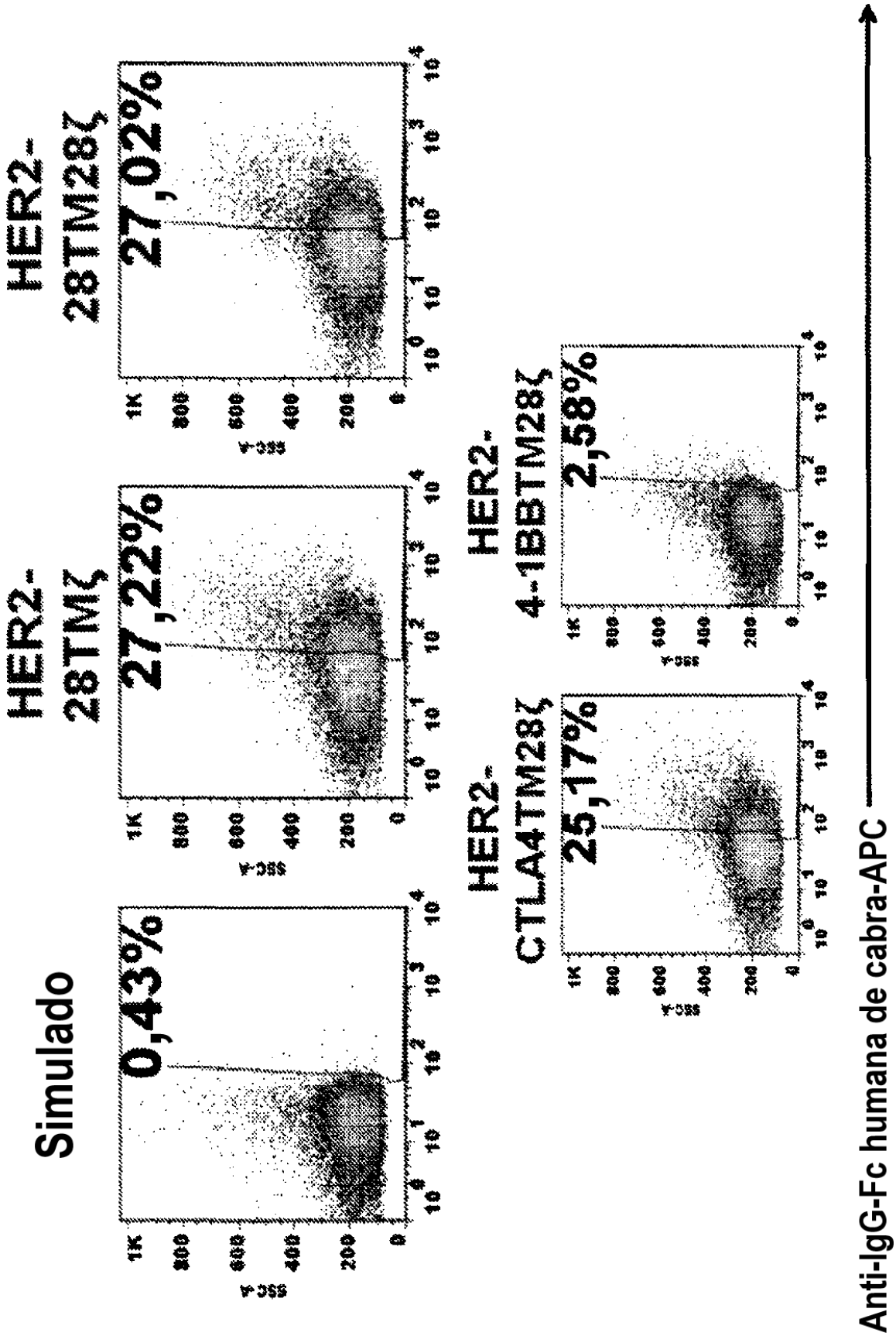

Simulado
0,43%
HER2-28TMζ
27,22%
HER2-28TM28ζ
27,02%
HER2-CTLA4TM28ζ
25,17%
HER2-4-1BBTM28ζ
2,58%
Anti-IgG-Fc humana de cabra-APC

FIG. 1

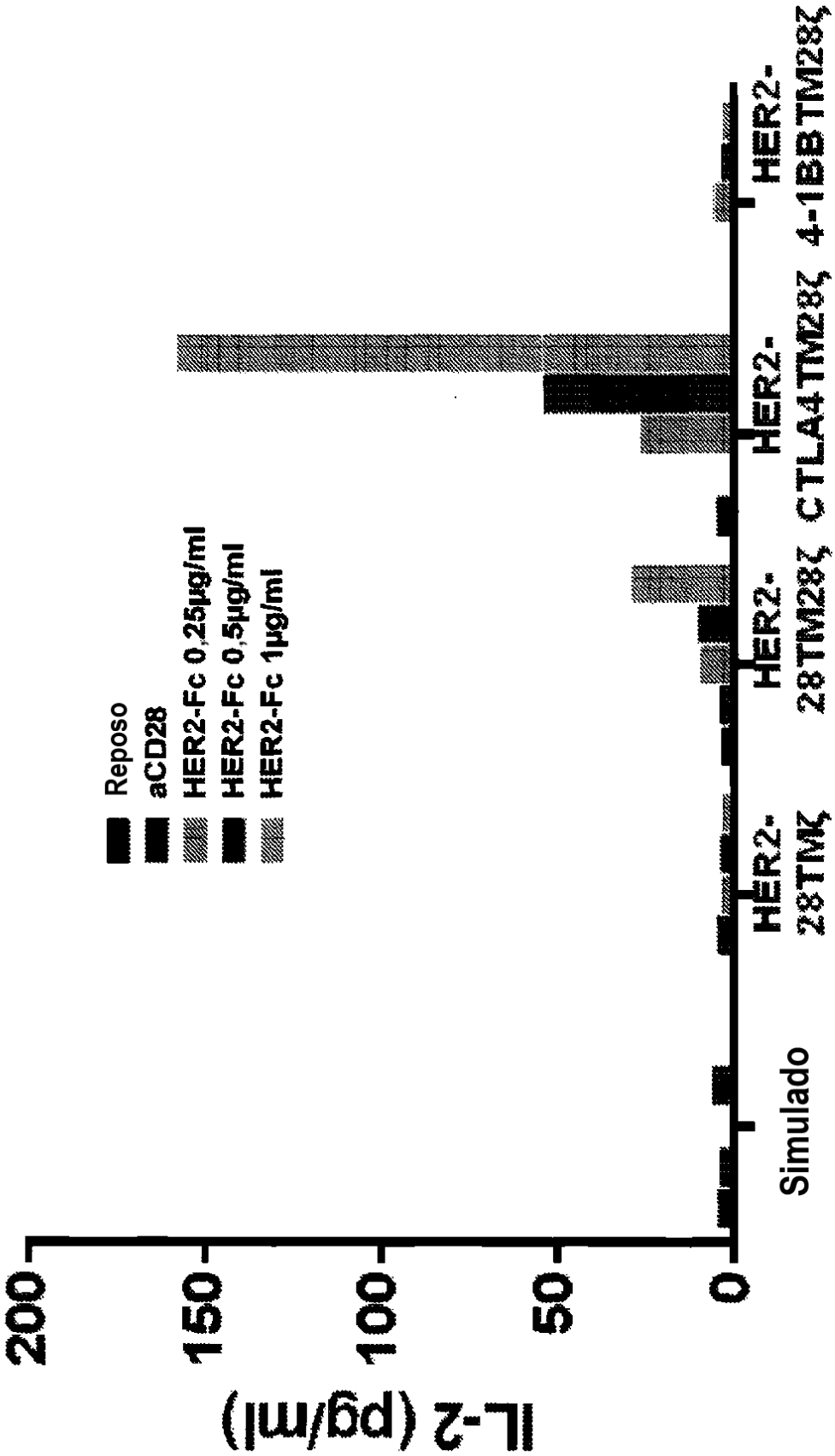

IL-2 (pg/ml)
200
150
100
50
0
Reposo
aCD28
HER2-Fc 0,25µg/ml
HER2-Fc 0,5µg/ml
HER2-Fc 1µg/ml
Simulado
HER2-28TMζ
HER2-28TM28ζ
HER2-CTLA4TM28ζ
HER2-4-1BBTM28ζ

FIG. 2

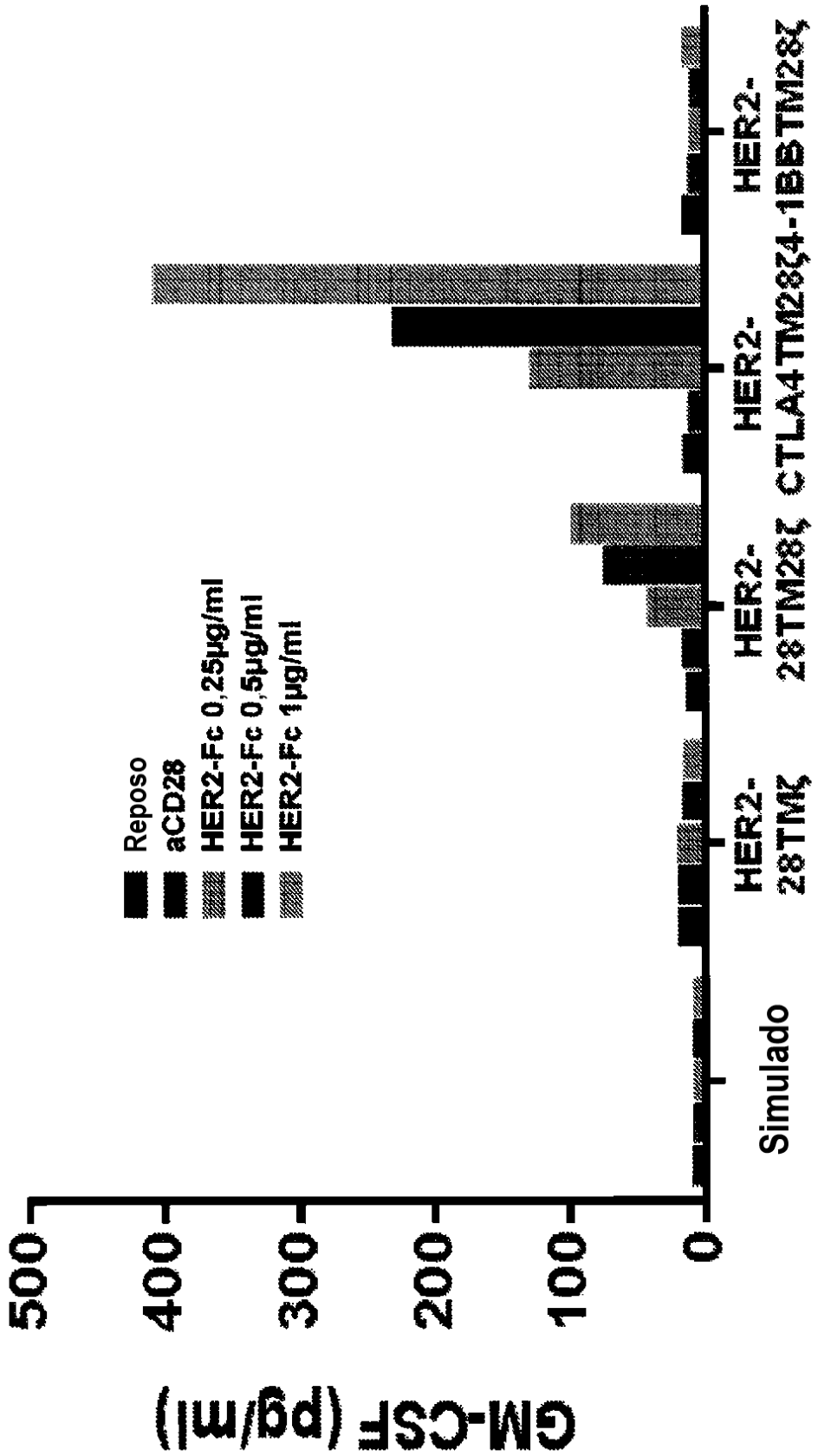

GM-CSF (pg/ml)
500
400
300
200
100
0
Reposo
aCD28
HER2-Fc 0,25µg/ml
HER2-Fc 0,5µg/ml
HER2-Fc 1µg/ml
Simulado
HER2-28TMζ
HER2-28TM28ζ
HER2-CTLA4TM28ζ
HER2-4-1BBTM28ζ

FIG. 3

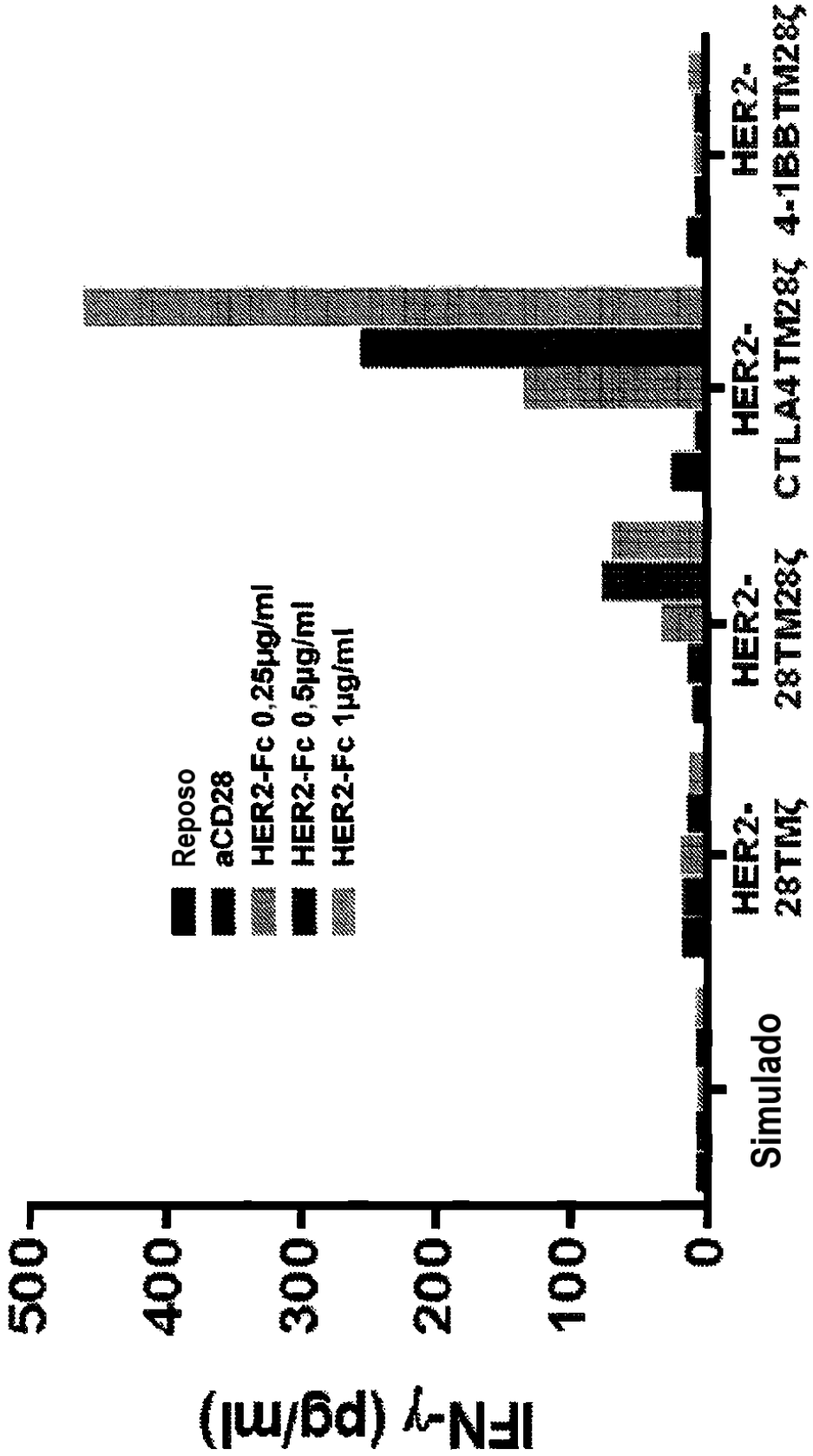

IFN-γ (pg/ml)
500
400
300
200
100
0
Simulado
HER2-28TMζ
HER2-28TM28ζ
HER2-CTLA4TM28ζ
HER2-4-1BBTM28ζ
Reposo
aCD28
HER2-Fc 0,25µg/ml
HER2-Fc 0,5µg/ml
HER2-Fc 1µg/ml

FIG. 4

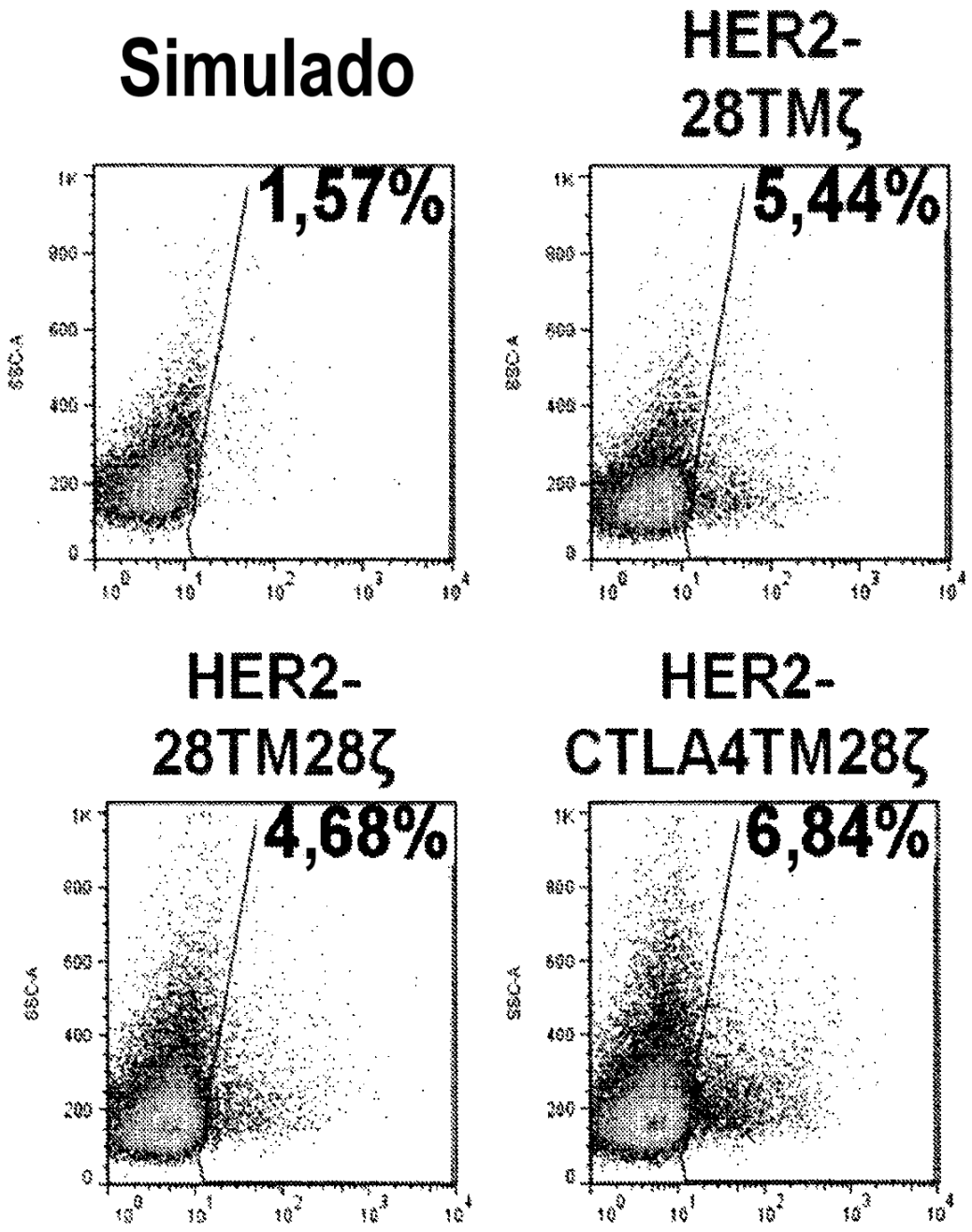

Simulado
1,57%
HER2-
28TMζ
5,44%
HER2-
28TM28ζ
4,68%
HER2-
CTLA4TM28ζ
6,84%
SSC-A

**FIG. 5**

A

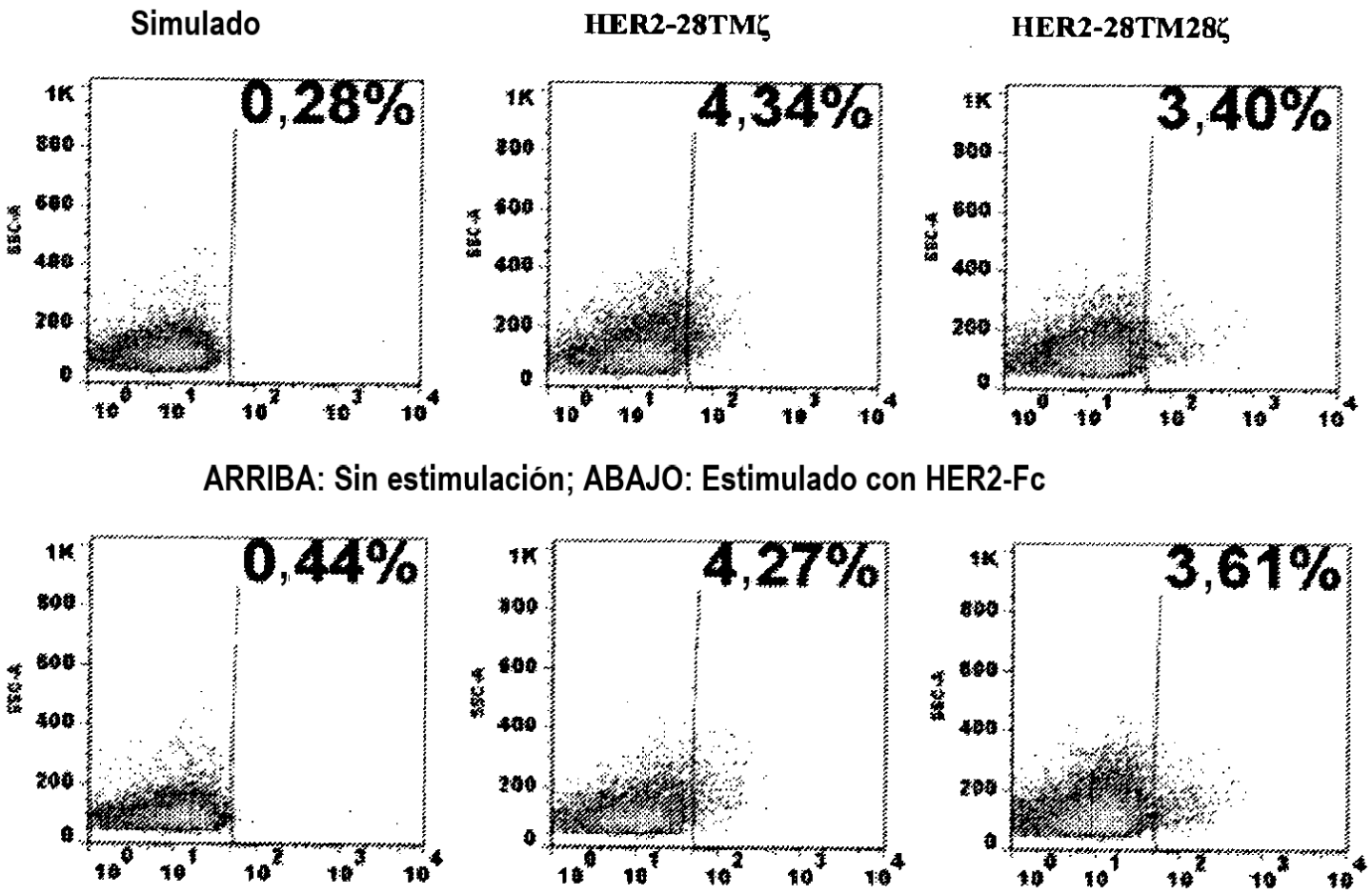
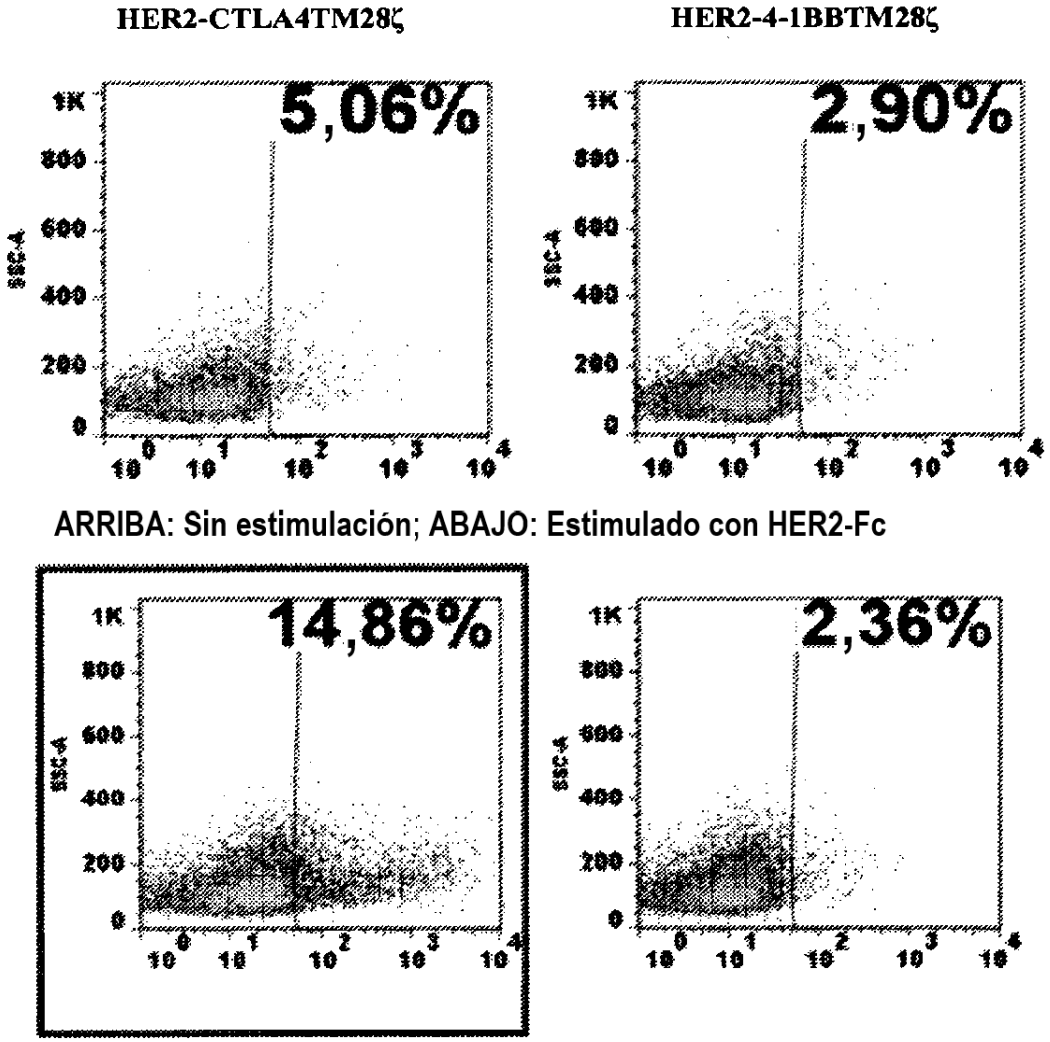

Simulado
HER2-28TMζ
HER2-28TM28ζ
0,28%
4,34%
3,40%
ARRIBA: Sin estimulación; ABAJO: Estimulado con HER2-Fc
0,44%
4,27%
3,61%

FIG. 6A

B




ARRIBA: Sin estimulación; ABAJO: Estimulado con HER2-Fc

FIG. 6B

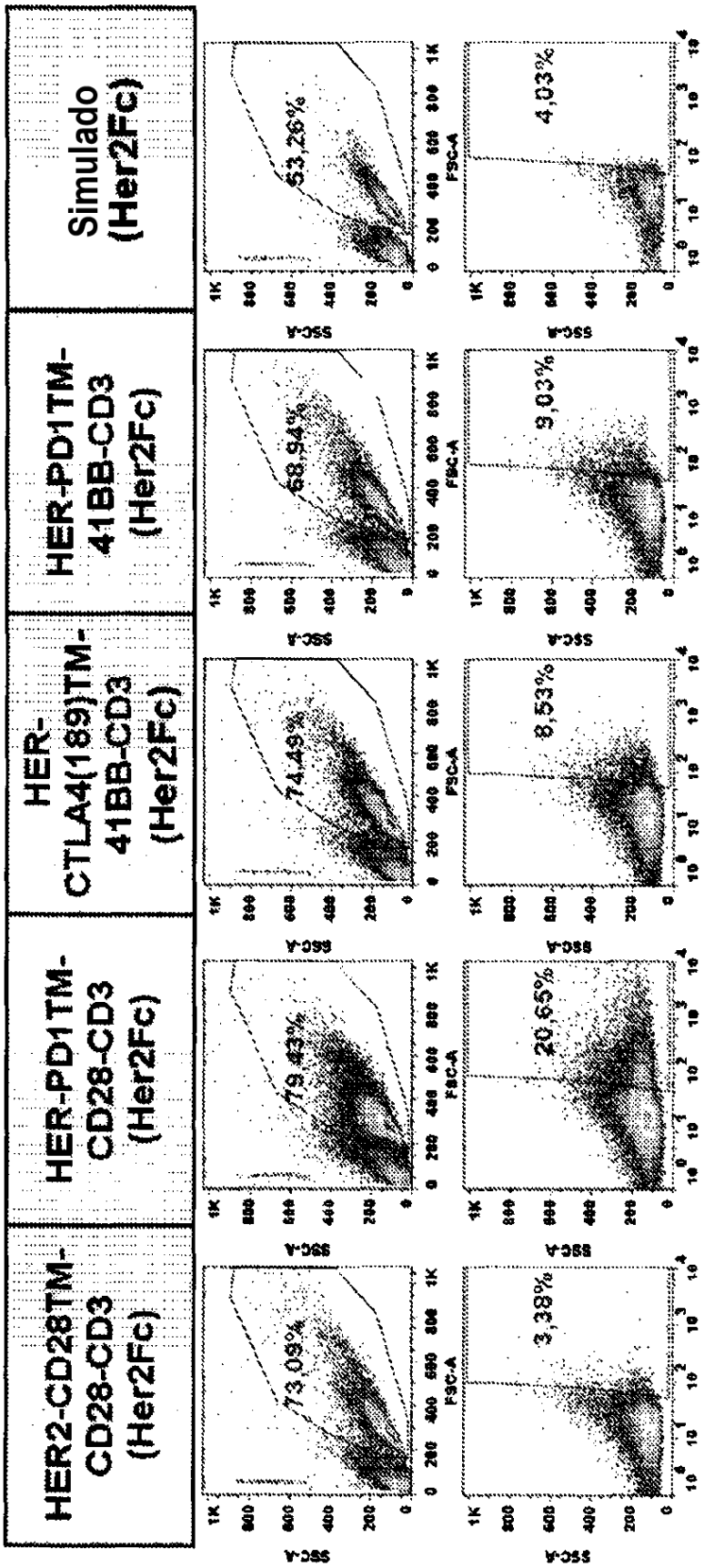

HER2-CD28TM-CD28-CD3 (Her2Fc)
HER-PD1TM-CD28-CD3 (Her2Fc)
HER-CTLA4(189)TM-41BB-CD3 (Her2Fc)
HER-PD1TM-41BB-CD3 (Her2Fc)
Simulado (Her2Fc)
73,05%
3,38%
79,43%
20,65%
74,49%
8,53%
68,94%
9,03%
53,26%
4,03%
SSC-A
FSC-A

FIG. 7

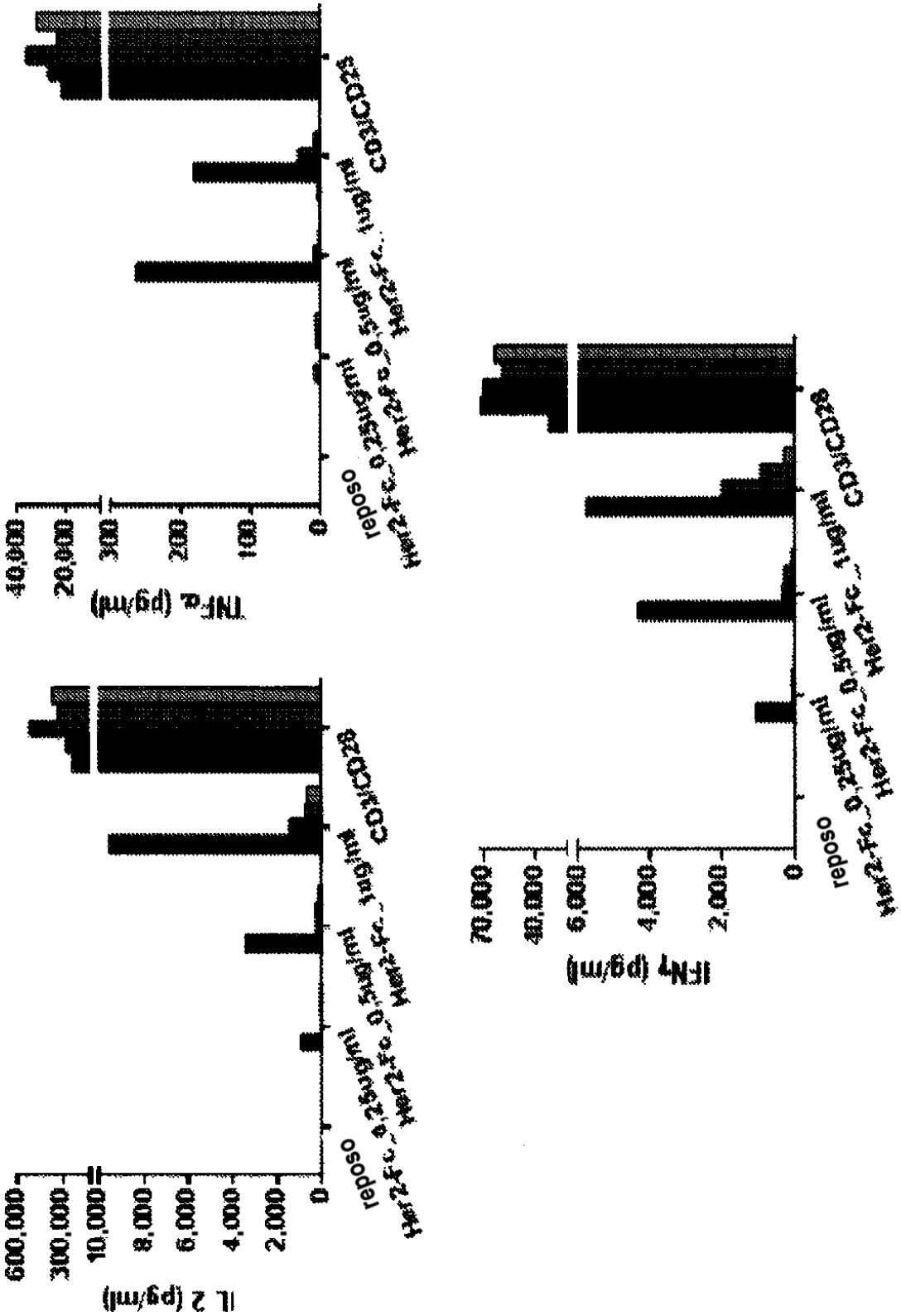

IL 2 (pg/ml)
600,000
300,000
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
reposo
Her2-Fc_0,25ug/ml
Her2-Fc_0,5ug/ml
Her2-Fc_1ug/ml
CD3/CD28
TNFα (pg/ml)
40,000
20,000
300
200
100
0
reposo
Her2-Fc_0,25ug/ml
Her2-Fc_0,5ug/ml
Her2-Fc_1ug/ml
CD3/CD28
IFNγ (pg/ml)
70,000
40,000
6,000
4,000
2,000
0
reposo
Her2-Fc_0,25ug/ml
Her2-Fc_0,5ug/ml
Her2-Fc_1ug/ml
CD3/CD28

FIG. 8

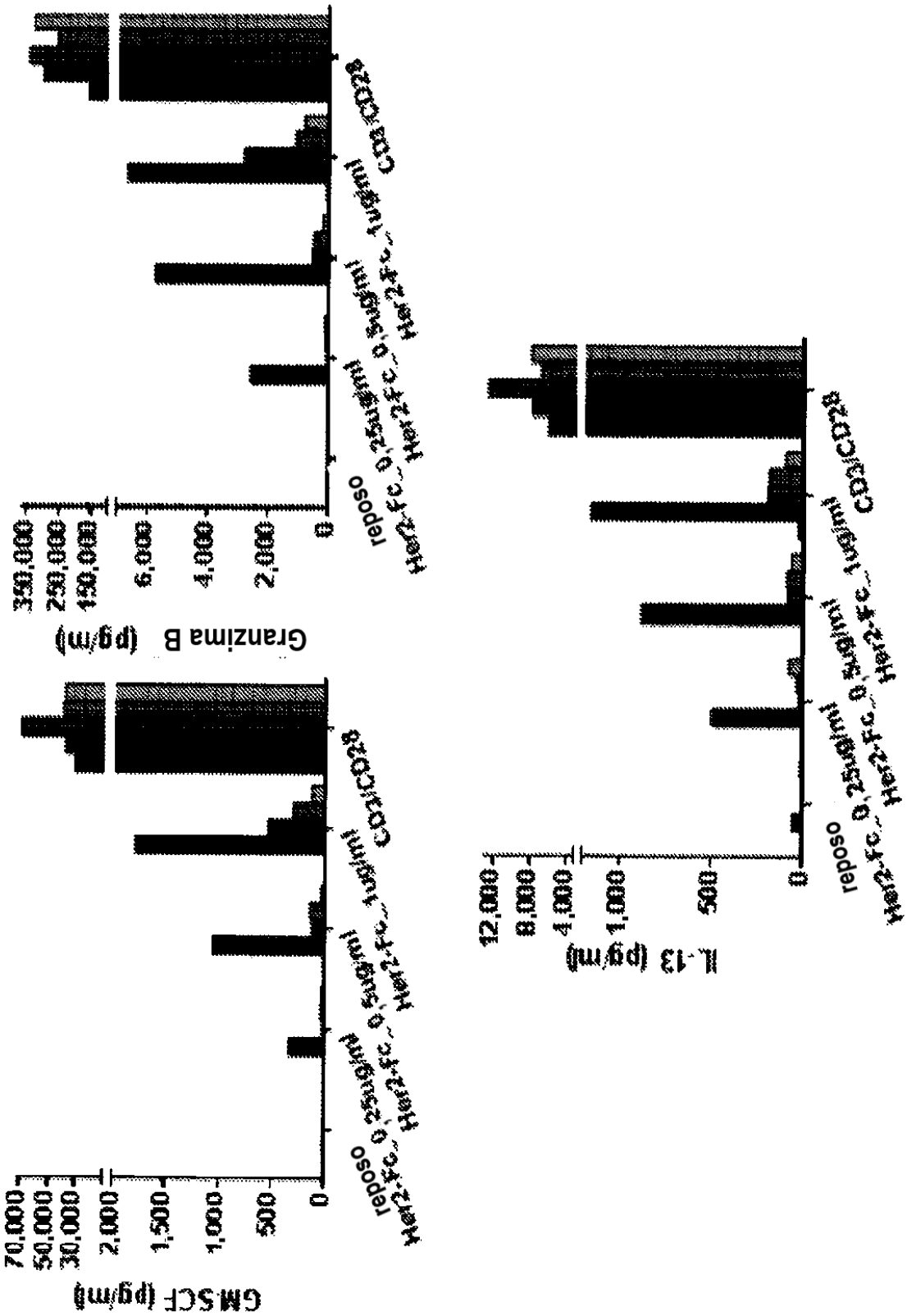

GM SCF (pg/ml)
70,000
50,000
30,000
2,000
1,500
1,000
500
0
reposo
Her2-Fc_ 0,25ug/ml
Her2-Fc_ 0,5ug/ml
Her2-Fc_ 1ug/ml
CD3/CD28
Granzima B (pg/ml)
350,000
250,000
150,000
6,000
4,000
2,000
0
reposo
Her2-Fc_ 0,25ug/ml
Her2-Fc_ 0,5ug/ml
Her2-Fc_ 1ug/ml
CD3/CD28
IL-13 (pg/ml)
12,000
8,000
4,000
1,000
500
0
reposo
Her2-Fc_ 0,25ug/ml
Her2-Fc_ 0,5ug/ml
Her2-Fc_ 1ug/ml
CD3/CD28

FIG. 9

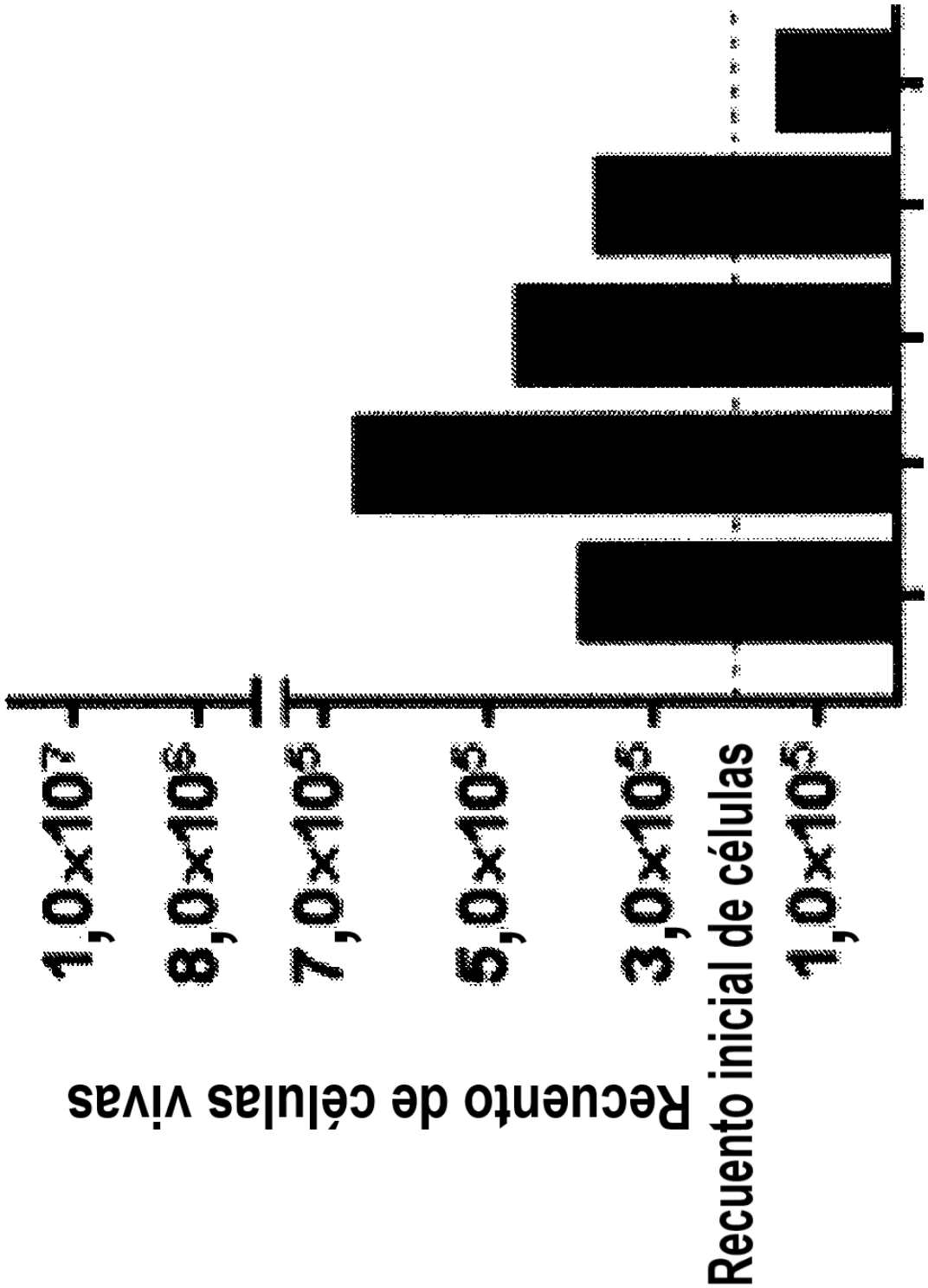

Recuento de células vivas
1,0x10^7
8,0x10^6
7,0x10^6
6,0x10^6
3,0x10^6
1,0x10^6
Recuento inicial de células

FIG. 10