

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 308**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 31/4188 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2014 PCT/US2014/060713**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015 WO15057852**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2014 E 14853242 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3057991**

54 Título: **Interruptores de células T con receptores de antígenos quiméricos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

15.10.2013 US 201361891347 P

25.10.2013 US 201361895704 P

06.06.2014 US 201462009056 P

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

10.02.2020

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
10550 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**KIM, CHANHYUK;
YOUNG, TRAVIS;
CAO, YU;
MA, JENNIFER;
KIM, MINSOO;
PINKERTON, STEPHANIE y
SCHULTZ, PETER, G.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 741 308 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

Interruptores de células T con receptores de antígenos quiméricos y usos de los mismos

5

Antecedentes de la invención

Las inmunoterapias, una vez consideradas “balas mágicas” por el premio Nobel Paul Ehrlich, están convirtiéndose rápidamente en alternativas atractivas a las quimioterapias. Específicamente, las inmunoterapias que usan células T modificadas genéticamente para “volver a enseñar” al sistema inmunitario a reconocer y eliminar células tumorales malignas están produciendo resultados emocionantes en ensayos clínicos en fase temprana. Tal terapia génica evita muchos mecanismos de resistencia a la quimioterapia y es activa contra enfermedad con recidiva/refractaria, ofreciendo una esperanza realista de una terapia curativa. Sin embargo, las técnicas de terapia génica se han encontrado con riesgos significativos en la práctica clínica incluyendo desregulación inmunitaria crónica e incluso muerte. En la búsqueda de inmunoterapias mejoradas, se ha establecido un método de activación y desactivación selectiva de células T modificadas genéticamente, que es tanto más seguro como más versátil que terapias efectoras que están actualmente sometiéndose a prueba en la práctica clínica.

La transferencia adoptiva de células T con receptores de antígenos quiméricos modificadas genéticamente (CAR-T) proporciona al sistema inmunitario con la capacidad de reconocer y eliminar células tumorales. Esta terapia ha logrado remisiones sostenidas en ensayos clínicos para pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) y leucemia linfoblástica aguda (ALL), y está surgiendo rápidamente como una alternativa poderosa a la quimioterapia. A pesar de estos éxitos, esta terapia padece problemas de seguridad graves debido a que la actividad persistente de las CAR-T conduce a linfopenia tóxica, e hipogammaglobulinemia crónica para dianas hematológicas, y citólisis fuera de diana mortal para dianas de tumores sólidos. Tanada *et al.*, 2012 Clin Cancer Res, 18(23):6436-6445 dan a conocer la redirección de células T modificadas genéticamente hacia diversos tipos de cáncer usando anticuerpos etiquetados. Kim *et al.*, 2012; Journal of the American Chemical Society; 134(24):9918-9921 dan a conocer la síntesis de anticuerpos bioespecíficos usando aminoácidos no naturales codificados genéticamente. Kim *et al.*, 2013, Current Opinion in Chemical Biology, 17(3):412-419 dan a conocer la conjugación de proteínas con aminoácidos no naturales codificados genéticamente.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un interruptor para activar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC), comprendiendo el interruptor: (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural, en el que el TID interacciona con una molécula de superficie en una célula diana, y en el que el CAR-ID se une al TID por medio del aminoácido no natural.

La presente invención también proporciona una composición que comprende una pluralidad de interruptores para activar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC), en la que un interruptor de la pluralidad de interruptores comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural, en la que el TID interacciona con una molécula de superficie en una célula diana, en la que el CAR-ID se une al TID por medio del aminoácido no natural, y en la que al menos aproximadamente el 60% de los interruptores son estructuralmente homólogos.

La presente invención también proporciona un primer interruptor de célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad, comprendiendo el interruptor: (i) un primer dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (ii) un primer dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural, en el que el TID interacciona con una primera molécula de superficie en una célula diana y en el que el TID comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio al TID por medio del aminoácido no natural, en el que el método comprende administrar el primer interruptor de CAR-EC y administrar además una primera célula efectora con receptor de antígeno quimérico que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une al primer CAR-ID del primer interruptor de CAR-EC a un sujeto.

Se dan a conocer en el presente documento interruptores de células efectoras con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) que comprenden: (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende una molécula pequeña; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural. El CAR-ID puede interaccionar con un receptor de antígeno quimérico (CAR) en una célula efectora. La célula efectora puede ser una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC). El dominio de interacción con la diana (TID) puede interaccionar con una molécula de superficie en una célula diana. El CAR-ID puede unirse al TID. El CAR-ID puede unirse de manera específica de sitio al TID. El TID puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El fragmento de anticuerpo puede comprender un Fab. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender al menos una

60

65

porción de una inmunoglobulina. Los interruptores de CAR-EC pueden comprender además un ligador. El ligador puede unir el CAR-ID al TID. El ligador puede unir de manera específica de sitio el CAR-ID al TID. El ligador puede unir de manera específica de sitio el CAR-ID al aminoácido no natural del TID. El ligador puede unir el CAR-ID al TID a través de uno o más grupos químicos. El grupo químico puede seleccionarse del grupo que consiste en oxima, triazol, ciclooctino, tetrazina, ciclopropeno, norborneno, trans-cicloocteno y selenocisteína. El grupo químico puede formarse entre el ligador y el TID. Alternativa o adicionalmente, el grupo químico puede formarse entre el ligador y el CAR-ID. Los interruptores de CAR-EC pueden comprender además uno o más ligadores adicionales. El uno o más ligadores adicionales pueden unir un TID adicional al CAR-ID. Alternativa o adicionalmente, el uno o más ligadores adicionales pueden unir un CAR-ID adicional al TID. El uno o más ligadores adicionales pueden conjugarse con el TID. Alternativamente, el uno o más ligadores adicionales pueden conjugarse con el CAR-ID. El uno o más ligadores adicionales pueden conectar el CAR-ID a un ligador que se une al TID. El ligador puede presentar una longitud de aproximadamente 25 Å. El ligador puede proporcionar una distancia entre el CAR-ID y TID de aproximadamente 2,5 Å a aproximadamente 100 Å. El CAR-ID puede ser un hapteno. El CAR-ID puede comprender FITC o derivados del mismo. El CAR-ID puede seleccionarse de DOTA, dinitrofenol, biotina y derivados de los mismos. El TID puede comprender un polipéptido que comprende el aminoácido no natural. El polipéptido puede basarse en o derivarse de un anticuerpo o fragmento del mismo. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de aminoácido del anticuerpo o fragmento a partir del cual el polipéptido se basa o se deriva. El polipéptido puede basarse en o derivarse de la cadena ligera del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a un aminoácido de la cadena ligera del anticuerpo a partir del cual el polipéptido se basa o se deriva. Por ejemplo, el aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de serina de la cadena ligera del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a la serina 202 de la cadena ligera del anticuerpo o un homólogo de la misma. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de glicina de la cadena ligera del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a la glicina 68 de la cadena ligera del anticuerpo o un homólogo de la misma. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de treonina de la cadena ligera del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a la treonina 109 de la cadena ligera del anticuerpo o un homólogo de la misma. El polipéptido puede basarse en o derivarse de una cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de lisina de la cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a la lisina 136 de la cadena pesada del anticuerpo o un homólogo de la misma. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de alanina de la cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a la alanina 123 de la cadena pesada del anticuerpo o un homólogo de la misma. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de serina de la cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a la serina 74 de la cadena pesada del anticuerpo o un homólogo de la misma. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de aminoácido de la cadena ligera del anticuerpo y un residuo de aminoácido de la cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de glicina de la cadena ligera del anticuerpo y un aminoácido de la cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de glicina de la cadena ligera del anticuerpo y un residuo de serina de la cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de serina de la cadena pesada del anticuerpo y un residuo de aminoácido de la cadena ligera del anticuerpo. El residuo de glicina de la cadena ligera del anticuerpo puede ser la glicina 68 o un homólogo de la misma. El residuo de serina de la cadena pesada del anticuerpo puede ser la serina 74 o un homólogo de la misma. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de serina de la cadena ligera del anticuerpo y un aminoácido de la cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de serina de la cadena ligera del anticuerpo y un residuo de lisina de la cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de lisina de la cadena pesada del anticuerpo y un residuo de aminoácido de la cadena ligera del anticuerpo. El residuo de serina de la cadena ligera del anticuerpo puede ser la serina 202 o un homólogo de la misma. El residuo de serina de la cadena pesada del anticuerpo puede ser la lisina 136 o un homólogo de la misma. El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo seleccionado de anticuerpo anti-EGFRvIII, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-CLL-1, anticuerpo anti-CEA, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-BCMA, anticuerpo anti-CS1 y fragmentos de los mismos. El TID puede seleccionarse de un anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-Her2 y fragmentos de los mismos. El CAR-ID puede comprender FITC y el TID puede comprender un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento del mismo. El CAR-ID puede comprender FITC y el TID puede comprender un anticuerpo anti-Her2 o un fragmento del mismo. El CAR-ID puede comprender FITC y el TID puede seleccionarse de un anticuerpo anti-CS1, anticuerpo anti-BCMA, anti-CLL1 anticuerpo, anticuerpo anti-CD33, o un fragmento de los mismos. El TID puede estar codificado por un nucleótido de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El TID puede comprender un polipéptido de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. La célula diana puede ser una célula cancerosa. La pureza de una pluralidad de interruptores de CAR-EC puede ser de al menos aproximadamente el 90%. La homogeneidad de una pluralidad de interruptores de CAR-EC puede ser de al menos aproximadamente el 90%. La homogeneidad estructural de una pluralidad de interruptores de CAR-EC puede ser de al menos aproximadamente el 90%.

Se dan a conocer adicionalmente en el presente documento interruptores de CAR-EC que comprenden (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID); y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que se une a una molécula de superficie en una diana, en los que el CAR-ID y el TID no comprenden dos o más aminoácidos

conectados por un enlace amida. El CAR-ID puede comprender de uno a cinco aminoácidos. El TID puede comprender de uno a cinco aminoácidos. Los interruptores de CAR-EC pueden tener una masa molar de menos de aproximadamente 1500 Da. Los interruptores de CAR-EC pueden tener una masa molar de menos de aproximadamente 2500 Da. Los interruptores de CAR-EC pueden comprender además un ligador. El ligador puede unir el CAR-ID al ligador. El CAR-ID y el TID pueden unirse de manera específica de sitio a través del ligador. Los interruptores de CAR-EC pueden comprender además uno o más ligadores adicionales. El uno o más ligadores adicionales pueden unir el CAR-ID a un TID adicional. Alternativa o adicionalmente, el uno o más ligadores adicionales pueden unir el TID a un CAR-ID adicional. El uno o más ligadores adicionales pueden conjugarse con el TID. Alternativamente, el uno o más ligadores adicionales pueden conjugarse con el CAR-ID. El uno o más ligadores adicionales pueden conectar el CAR-ID a un ligador que se une al TID. El CAR-ID puede seleccionarse de FITC, dinitrofenol, biotina y un derivado de los mismos. El CAR-ID puede comprender FITC. El TID puede unirse a una diana que es al menos el 50% homóloga a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El TID puede seleccionarse de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico, un antagonista de receptor de colecistocinina B de molécula pequeña, una hormona liberadora de hormona luteinizante de péptido de 10 meros, folato, un derivado de los mismos o una versión modificada de los mismos. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico. El TID puede comprender folato. El TID puede unirse a una diana que es al menos el 50% homóloga a un receptor seleccionado de un receptor de folato, un receptor de hormona liberadora de hormona luteinizante y un receptor de colecistocinina B. El CAR-ID puede comprender FITC y el TID puede unirse a una molécula de superficie que es al menos el 50% homóloga a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El CAR-ID puede comprender FITC y el TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico. El CAR-ID puede comprender FITC y el TID puede unirse a una molécula de superficie que es al menos el 50% homóloga a un receptor de folato. El componente de unión a receptor de antígeno quimérico puede comprender FITC y el TID puede comprender folato o un derivado del mismo. La diana puede ser una célula cancerosa. La homogeneidad de una pluralidad de interruptores de CAR-EC puede ser de al menos aproximadamente el 90%.

Se dan a conocer además en el presente documento interruptores de CAR-EC que comprenden: (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende FITC o un derivado del mismo; (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y (c) un ligador que une el CAR-ID al TID. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede seleccionarse de un anticuerpo anti-Her2, anticuerpo anti-CD19 o un fragmento de los mismos. La geometría de un interruptor de CAR-EC con el ligador puede ser diferente de la geometría de un interruptor de CAR-EC sin el ligador. Por ejemplo, el ángulo del CAR-ID con respecto al TID puede alterarse mediante el ligador en comparación con el ángulo del CAR-ID con respecto al TID en un interruptor sin un ligador. La distancia entre el CAR-ID y el TID en un interruptor con un ligador puede ser diferente de la distancia entre el CAR-ID y el TID en un interruptor sin un ligador. Por ejemplo, la distancia entre el CAR-ID y el TID puede ser mayor en un interruptor con un ligador que la distancia entre el CAR-ID y el TID en un interruptor sin el ligador.

Se da a conocer en el presente documento un interruptor para activar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC), comprendiendo el interruptor: (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural, en el que el TID interacciona con una molécula de superficie en una célula diana. El CAR-ID puede unirse al TID. El CAR-ID puede unirse al TID por medio del aminoácido no natural. El CAR-ID puede unirse de manera específica de sitio al aminoácido no natural del TID. El interruptor puede comprender además un ligador. El ligador puede unir el CAR-ID al TID. El ligador puede unir el CAR-ID al TID por medio del aminoácido no natural. El ligador puede unir de manera específica de sitio el CAR-ID al aminoácido no natural del TID. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede ser un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender un grupo aminoóxilo, grupo azida, grupo ciclooctino, o una combinación de los mismos en uno o más extremos terminales. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol. El ligador puede comprender triazol. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. La molécula pequeña puede ser un hapteno. La molécula pequeña puede ser isotiocianato de fluoresceína (FITC). El TID puede conjugarse con un isotiocianato de FITC. El interruptor puede comprender además un ligador que puede conjugarse con un isotiocianato de FITC. La molécula pequeña puede ser biotina. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo anti-CD19. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un dominio variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-CD19. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-BMSA, anti-CEA, anti-CLL1, anti-CS1, anti-EGFR y anti-Her2. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un dominio variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-BMSA, anti-CEA, anti-CLL1, anti-CS1, anti-EGFR y anti-Her2. El TID puede estar codificado por un nucleótido de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El TID puede comprender un polipéptido de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El aminoácido no natural puede insertarse en la porción del anticuerpo a partir de la cual el TID puede basarse o derivarse. El

aminoácido no natural puede reemplazar a un aminoácido del anticuerpo a partir del cual el TID puede basarse o derivarse. El aminoácido no natural puede ser p-acetilfenilalanina (pAcF). El aminoácido no natural puede ser p-azidofenilalanina (pAzF). El aminoácido no natural puede insertarse en la cadena ligera del anticuerpo. El aminoácido no natural puede insertarse en la cadena pesada del anticuerpo.

5 Se dan a conocer además en el presente documento células efectoras con receptores de antígenos quiméricos que expresan uno o más receptores de antígenos quiméricos (CAR). El uno o más CAR pueden comprender un anticuerpo anti-FITC o fragmento del mismo. El anticuerpo anti-FITC o fragmento del mismo puede seleccionarse de scFv 4-4-20 murino, scFv 4D5Flu quimérico, scFv 4M5.3 murino y scFv FITC-E2 humano. El CAR puede estar codificado por uno o más polinucleótidos seleccionados de SEQ ID NO: 1-4. El CAR puede estar codificado por un polinucleótido que es al menos aproximadamente el 70% idéntico a uno o más polinucleótidos seleccionados de SEQ ID NO: 1-4.

15 Se da a conocer en el presente documento una composición que comprende una pluralidad de interruptores para activar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC), en la que un interruptor de la pluralidad de interruptores comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que interacciona con una molécula de superficie en una célula diana, en la que al menos aproximadamente el 60% de los interruptores son estructuralmente homólogos. Al menos aproximadamente el 80% de los interruptores pueden ser estructuralmente homólogos. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. La molécula pequeña puede ser isotiocianato de fluoresceína (FITC). La molécula pequeña puede ser biotina. La molécula pequeña puede ser dinitrofenol. El TID puede comprender una molécula pequeña. La molécula pequeña puede ser ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. La molécula pequeña puede ser folato o un derivado del mismo. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo anti-CD19. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un dominio variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-CD19. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-BMSA, anti-CEA, anti-CLL1, anti-CS1, anti-EGFR y anti-Her2. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un dominio variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-BMSA, anti-CEA, anti-CLL1, anti-CS1, anti-EGFR y anti-Her2. El TID puede estar codificado por un nucleótido de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El TID puede comprender un polipéptido de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender un aminoácido no natural. El aminoácido no natural puede ser p-acetilfenilalanina (pAcF). El aminoácido no natural puede ser p-azidofenilalanina (pAzF). El interruptor de la pluralidad de interruptores puede comprender además un ligador. El ligador puede unir el CAR-ID al TID. El ligador puede unir el CAR-ID un TID por medio de un aminoácido no natural. El ligador puede unir de manera específica de sitio el CAR-ID a un aminoácido no natural del TID. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede ser un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender un grupo aminoóxido, grupo azida, grupo ciclooctino, o una combinación de los mismos en uno o más extremos terminales. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol. El ligador puede comprender triazol.

45 Se da a conocer en el presente documento una composición que comprende una pluralidad de interruptores para activar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC), en la que un interruptor de la pluralidad de interruptores comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un polipéptido, en la que el CAR-ID se une al mismo sitio predeterminado en el TID en al menos el 60% de los interruptores. El CAR-ID puede unirse al mismo sitio predeterminado en el TID en al menos aproximadamente el 80% de los interruptores. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. La molécula pequeña puede ser isotiocianato de fluoresceína (FITC). La molécula pequeña puede ser biotina. La molécula pequeña puede ser dinitrofenol. El TID puede comprender una molécula pequeña. La molécula pequeña puede ser ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. La molécula pequeña puede ser folato o un derivado del mismo. El TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo anti-CD19. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un dominio variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-CD19. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-BMSA, anti-CEA, anti-CLL1, anti-CS1, anti-EGFR y anti-Her2. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un dominio variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-BMSA, anti-CEA, anti-CLL1, anti-CS1, anti-EGFR y anti-Her2. El TID puede estar codificado por un nucleótido de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido de

una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El TID puede comprender un polipéptido de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender un aminoácido no natural. El aminoácido no natural puede ser p-acetilfenilalanina (pAcF). El aminoácido no natural puede ser p-azidofenilalanina (pAzF). El interruptor de la pluralidad de interruptores puede comprender además un ligador. El ligador puede unir el CAR-ID al TID. El ligador puede unir el CAR-ID al TID por medio de un aminoácido no natural. El ligador puede unir de manera específica de sitio el CAR-ID a un aminoácido no natural del TID. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede ser un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender un grupo aminoóxilo, grupo azida, grupo ciclooctino, o una combinación de los mismos en uno o más extremos terminales. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol. El ligador puede comprender triazol. El sitio predeterminado en el TID puede ser un residuo de aminoácido. El residuo de aminoácido puede ser un aminoácido no natural. El aminoácido no natural puede ser p-acetilfenilalanina (pAcF). El aminoácido no natural puede ser p-azidofenilalanina (pAzF).

Se dan a conocer además en el presente documento métodos de producción de interruptores de CAR-EC, que comprenden unir de manera específica de sitio un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) a un dominio de interacción con la diana (TID), produciendo de ese modo un interruptor de CAR-EC. Alternativa o adicionalmente, el método de producción de un interruptor de CAR-EC puede comprender (a) producir un dominio de interacción con la diana (TID) incorporando un aminoácido no natural en un polipéptido; y (b) poniendo en contacto el TID con un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID), produciendo de ese modo un interruptor de CAR-EC. El método puede comprender además acoplar un primer ligador al TID para producir un primer producto intermedio de interruptor que comprende el TID y el primer ligador. El primer ligador puede acoplarse al TID mediante ligación de oxima. El método puede comprender además acoplar un segundo ligador al CAR-ID para producir un segundo producto intermedio de interruptor que comprende el CAR-ID y el segundo ligador. El segundo ligador puede acoplarse al CAR-ID mediante ligación de oxima. Poner en contacto el TID con el CAR-ID puede comprender poner en contacto el primer producto intermedio de interruptor con el segundo producto intermedio de interruptor. Poner en contacto el primer producto intermedio de interruptor con el segundo producto intermedio de interruptor puede comprender realizar una reacción de química "click". Poner en contacto el primer producto intermedio de interruptor con el segundo producto intermedio de interruptor puede comprender realizar una reacción de cicloadición. La reacción de cicloadición puede ser una reacción de cicloadición [3+2].

Se da a conocer en el presente documento un método de producción de un interruptor que comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID); y (b) un dominio de interacción con la diana (TID), comprendiendo el método: (a) acoplar un primer ligador al TID para producir un primer producto intermedio de interruptor que comprende el primer ligador conjugado al TID; (b) acoplar el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID, produciendo de ese modo el interruptor. El método puede comprender además acoplar un segundo ligador al CAR-ID para producir un segundo producto intermedio de interruptor que comprende el segundo ligador conjugado al CAR-ID. Acoplar el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender acoplar el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor. Acoplar el primer ligador al TID puede comprender una ligación de oxima. El segundo ligador puede comprender un ciclooctino. Acoplar el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una reacción de cicloadición. El primer ligador puede comprender una azida. La reacción de cicloadición puede comprender hacer reaccionar el ciclooctino del segundo ligador con la azida del primer ligador. La reacción de cicloadición puede comprender una reacción de cicloadición [3+2]. El TID puede comprender una molécula pequeña. La molécula pequeña puede ser ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. La molécula pequeña puede ser folato o un derivado del mismo. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo anti-CD 19. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-BMSA, anti-CEA, anti-CLL1, anti-CS1, anti-EGFR y anti-Her2. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un dominio variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-BMSA, anti-CEA, anti-CLL1, anti-CS1, anti-EGFR y anti-Her2. El TID puede estar codificado por un nucleótido de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El TID puede comprender un polipéptido de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender un aminoácido no natural. El aminoácido no natural puede ser p-acetilfenilalanina (pAcF). El aminoácido no natural puede ser p-azidofenilalanina (pAzF). El CAR-ID puede comprender isotiocianato de fluoresceína (FITC). La molécula pequeña puede ser biotina. La molécula pequeña puede ser dinitrofenol. El primer ligador puede ser un ligador bifuncional. El primer ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El primer ligador puede ser un ligador homobifuncional. El primer ligador puede comprender un grupo aminoóxilo, grupo azida, grupo ciclooctino, o una combinación de los mismos en

uno o más extremos terminales. El primer ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol. El primer ligador puede comprender ciclooctino. El primer ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El primer ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser un 1,2,3-triazol o un 1,2,4-triazol. El segundo ligador puede ser un ligador bifuncional. El segundo ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El segundo ligador puede ser un ligador homobifuncional. El segundo ligador puede comprender un grupo aminooxilo, grupo azida, grupo ciclooctino, o una combinación de los mismos en uno o más extremos terminales. El segundo ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol. El segundo ligador puede comprender ciclooctino. El segundo ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El segundo ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser un 1,2,3-triazol o un 1,2,4-triazol.

Se dan a conocer en el presente documento kits que comprenden cualquiera de los interruptores de células efectoras con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) dados a conocer. El kit puede comprender además una CAR-EC. La CAR-EC puede comprender un receptor de antígeno quimérico (CAR) que interacciona con un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) del interruptor de CAR-EC. La CAR-EC puede comprender una célula T que expresa el CAR. El kit puede comprender además uno o más interruptores de CAR-EC adicionales dados a conocer en el presente documento. Los interruptores de CAR-EC pueden ser diferentes. Los interruptores de CAR-EC pueden comprender dominios de interacción con la diana (TID) diferentes. Los interruptores de CAR-EC pueden comprender CAR-ID diferentes. Los interruptores de CAR-EC pueden ser similares. Los interruptores de CAR-EC pueden comprender el mismo TID. Los interruptores de CAR-EC pueden comprender el mismo CAR-ID.

Se dan a conocer en el presente documento kits que comprenden un primer producto intermedio de interruptor. El primer producto intermedio de interruptor puede comprender un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID). El primer producto intermedio de interruptor puede comprender además un primer ligador. El primer ligador puede conjugarse con el CAR-ID. El kit puede comprender además un segundo producto intermedio de interruptor. El segundo producto intermedio de interruptor puede comprender un primer dominio de interacción con la diana (TID). El segundo producto intermedio de interruptor puede comprender además un segundo ligador. El segundo ligador puede conjugarse con el primer TID. El kit puede comprender además una CAR-EC. La CAR-EC puede comprender un receptor de antígeno quimérico (CAR) que interacciona con un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) del interruptor de CAR-EC. La CAR-EC puede comprender una célula T que expresa el CAR. El kit puede comprender además uno o más productos intermedios de interruptor adicionales. El uno o más productos intermedios de interruptor pueden comprender uno o más CAR-ID adicionales. Los CAR-ID del uno o más productos intermedios de interruptor adicionales pueden ser diferentes del CAR-ID del primer producto intermedio de interruptor. Los CAR-ID del uno o más productos intermedios de interruptor adicionales pueden ser iguales que el CAR-ID del primer producto intermedio de interruptor. El uno o más productos intermedios de interruptor adicionales que comprenden el CAR-ID pueden comprender además un ligador. El ligador del uno o más productos intermedios de interruptor adicionales que comprende el CAR-ID puede ser diferente del primer ligador del primer producto intermedio de interruptor. El ligador del uno o más productos intermedios de interruptor adicionales que comprenden el CAR-ID puede ser igual que el primer ligador del primer producto intermedio de interruptor. Alternativa o adicionalmente, el uno o más productos intermedios de interruptor pueden comprender uno o más TID adicionales. Los TID del uno o más productos intermedios de interruptor adicionales pueden ser diferentes del TID del segundo producto intermedio de interruptor. Los TID del uno o más productos intermedios de interruptor adicionales pueden ser iguales que el TID del segundo producto intermedio de interruptor. El uno o más productos intermedios de interruptor adicionales que comprenden el TID pueden comprender además un ligador. El ligador del uno o más productos intermedios de interruptor adicionales que comprenden el TID puede ser diferente del segundo ligador del segundo producto intermedio de interruptor. El ligador del uno o más productos intermedios de interruptor adicionales que comprenden el TID puede ser igual que el segundo ligador del segundo producto intermedio de interruptor.

Se dan a conocer además en el presente documento compuestos de fórmula XIII:

A-L-B (fórmula XIII)

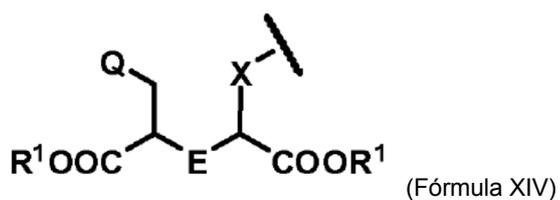
en la que:

A es un derivado de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado de ácido 2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metilamino)benzamido)pentanodioico (folato);

L es un enlace o un ligador; y

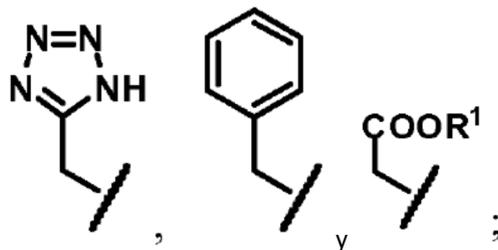
B es un derivado de fluoresceína o un derivado de biotina.

En algunas realizaciones, A de fórmula XIII (A-L-B) es un derivado de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico. El derivado de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico puede ser de fórmula XIV:

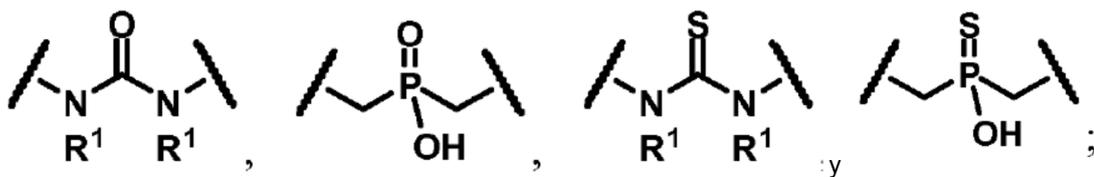


en la que:

- 5 Q se selecciona del grupo que consiste en:



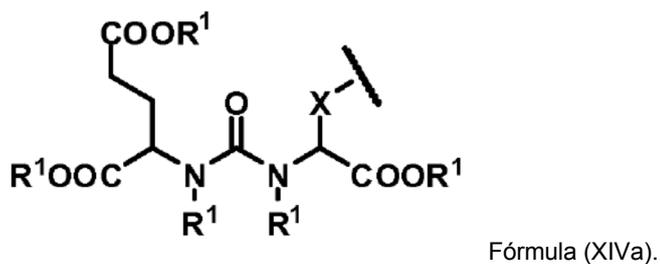
- 10 E se selecciona del grupo que consiste en:



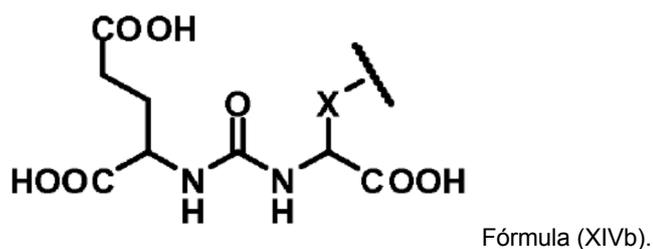
X es alquileo C₁-C₅ o alquileo C₁-C₄(C=O)-; y

- 15 cada R¹ se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₄ o haloalquilo C₁-C₄.

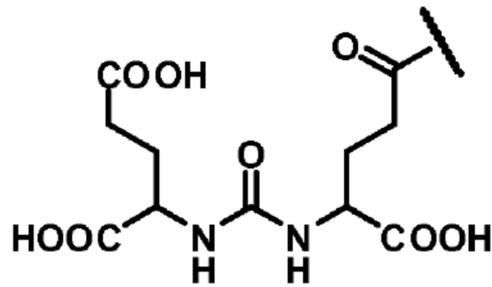
El derivado de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico puede ser de fórmula XIVa:



- 20 El derivado de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico puede ser el derivado de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico de fórmula IVb:

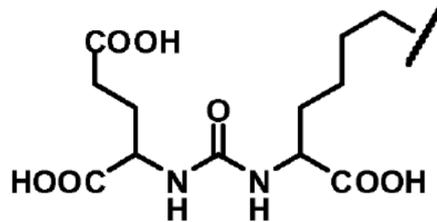


- 25 El derivado de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico puede ser de fórmula XIVc:



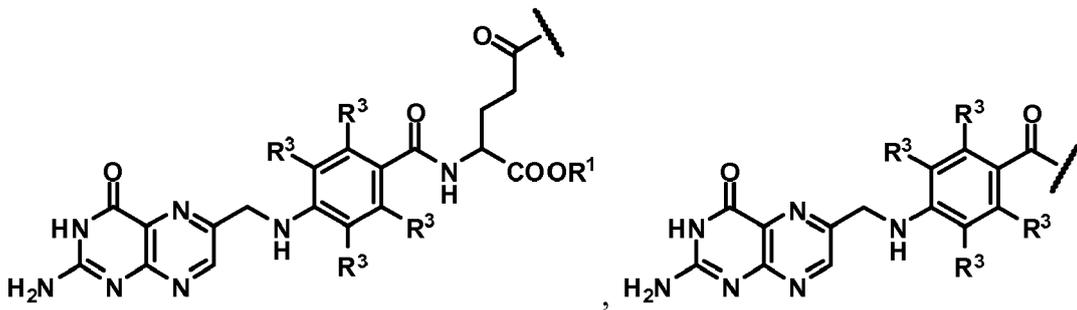
Fórmula (XIVc).

El derivado de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico puede ser de fórmula XIVd:

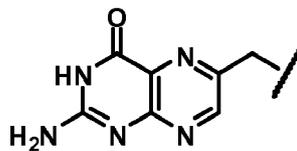


Fórmula (XIVd).

En algunas realizaciones, A de fórmula XIII (A-L-B) es un derivado de folato. El derivado de folato puede seleccionarse del grupo que consiste en:



y

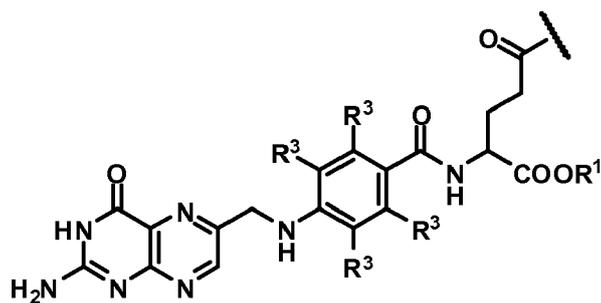


en las que:

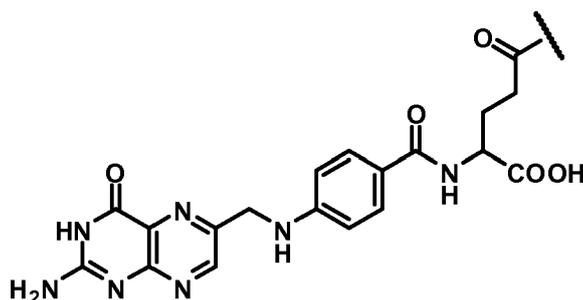
R¹ es hidrógeno, alquilo C₁-C₄ o haloalquilo C₁-C₄; y

cada R³ se selecciona independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo C₁-C₄ y alcoxilo C₁-C₄.

El derivado de folato puede ser:

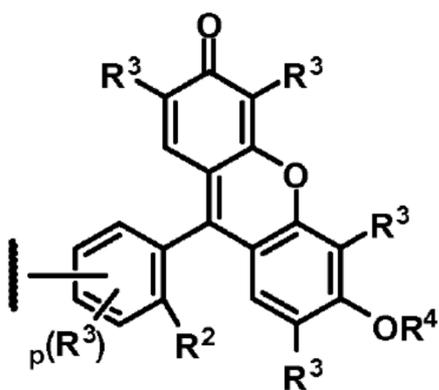


El derivado de folato puede ser:

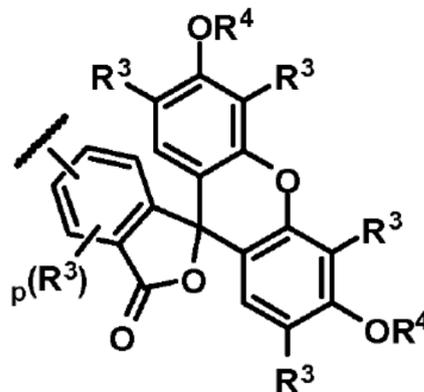


5

En algunas realizaciones, B de fórmula XIII (A-L-B) es un derivado de fluoresceína. El derivado de fluoresceína puede seleccionarse de fórmula XV y fórmula XVI:



Fórmula (XV)



Fórmula (XVI)

10

en las que:

R^2 es $-C(=O)O(R^1)$ o $-C(=O)N(R^a)_2$;

15

cada R^a se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_4 ; o

dos R^a tomados juntos forman un anillo de heterociclilo opcionalmente sustituido;

20

cada R^3 se selecciona independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo C_1-C_4 y alcoxilo C_1-C_4 ;

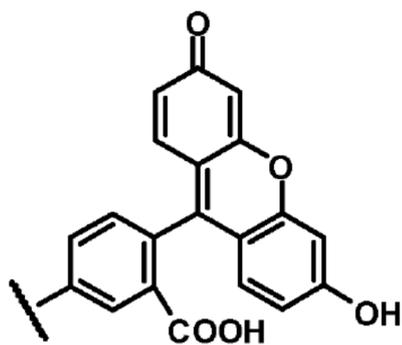
p es 0-3;

R^4 es hidrógeno, alquilo C_1-C_4 , $-C(=O)$ alquilo C_1-C_4 o $-CH_2-C(=O)OR^1$; y

25

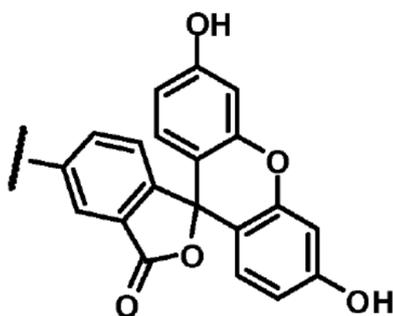
R^1 es hidrógeno, alquilo C_1-C_4 o haloalquilo C_1-C_4 .

El derivado de fluoresceína de fórmula XV puede ser de fórmula XVa:



Fórmula (XVa).

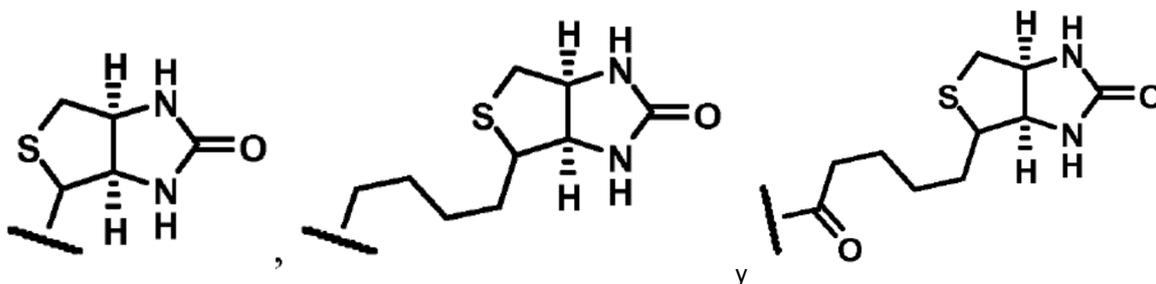
El derivado de fluoresceína de fórmula XVI puede ser de fórmula XVIa:



Fórmula (XVIa).

5

B de fórmula XIII (A-L-B) puede ser un derivado de biotina. El derivado de biotina puede seleccionarse del grupo que consiste en:



10

15

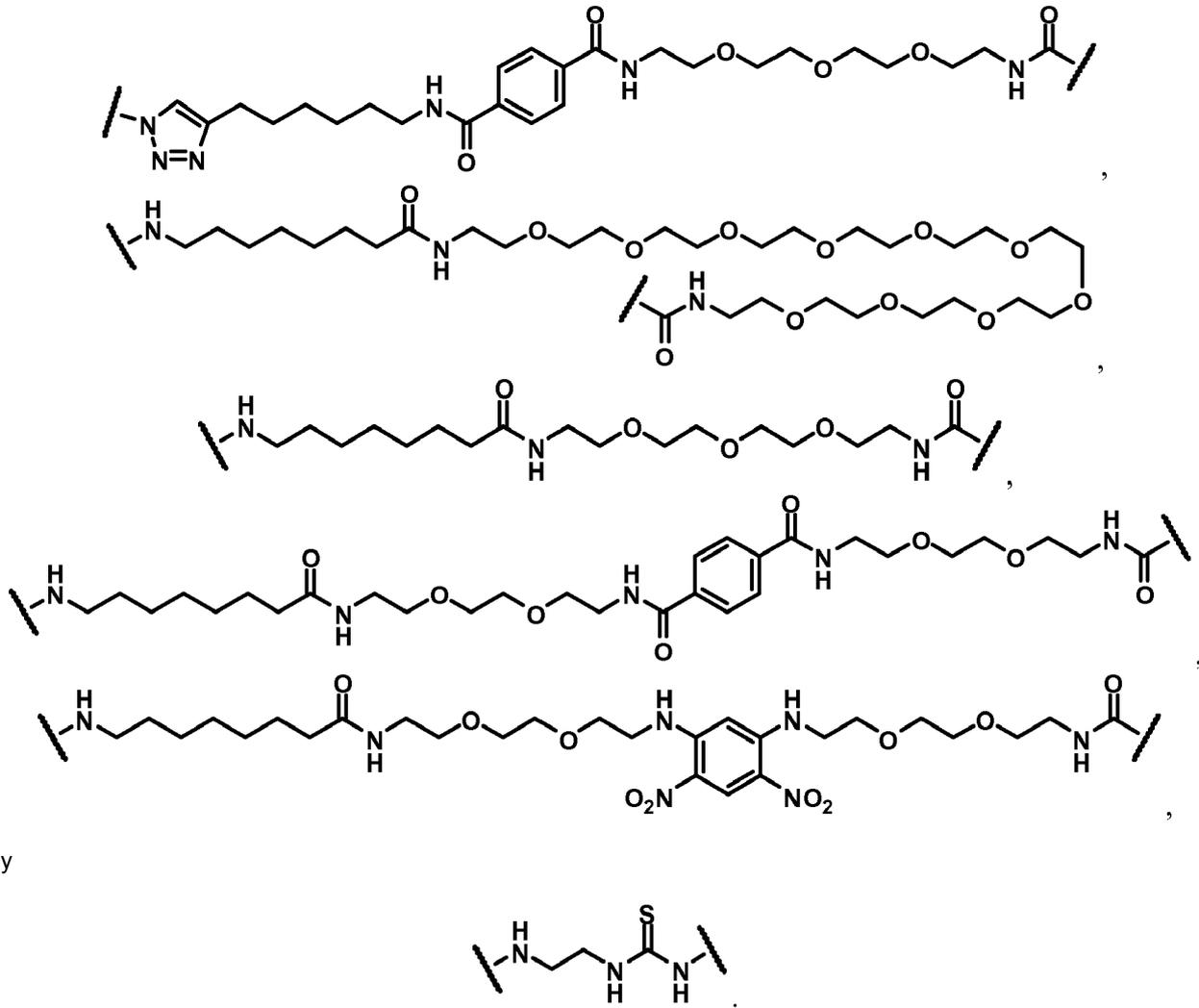
20

25

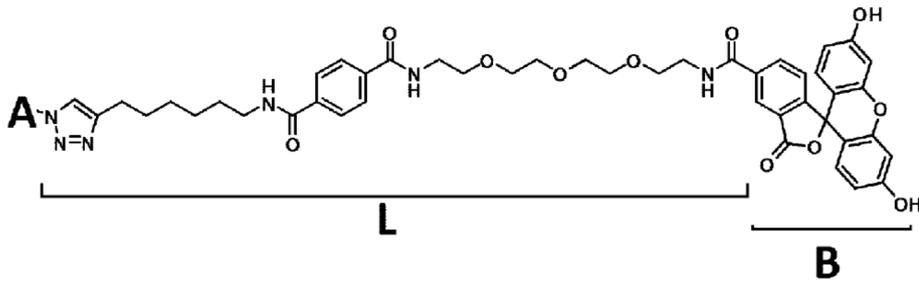
30

L de fórmula XIII (A-L-B) puede ser un ligador. El ligador puede comprender un triazol. El triazol puede ser un 1,2,3-triazol. El triazol puede ser un 1,2,4-triazol. El ligador puede comprender un arilo o un heteroarilo. El ligador puede comprender un arilo. El arilo puede ser fenilo. El fenilo puede estar disustituido. El fenilo disustituido puede ser fenilo 1,4-disustituido. El fenilo disustituido puede ser fenilo 1,3-disustituido. El fenilo puede estar trisustituido. El fenilo puede estar tetrasustituido. Dos de los sustituyentes del fenilo sustituido pueden ser NO₂. En algunos casos, el ligador no comprende un sustituyente de bencilo. El ligador puede comprender una o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender múltiples unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 2 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 3 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 4 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 5 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 6 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 7 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 8 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 9 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 10 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 11 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 12 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 13 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 14 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender una amida en un extremo. El ligador puede comprender una amida en un extremo y una amina en el otro extremo. El ligador puede comprender una amida en un extremo y un triazol en el otro extremo.

El ligador puede seleccionarse del grupo que consiste en:

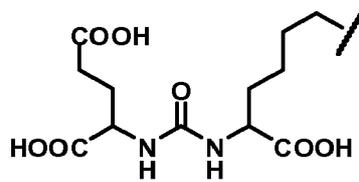


La fórmula XIII (A-L-B) puede ser de fórmula XIIIa:



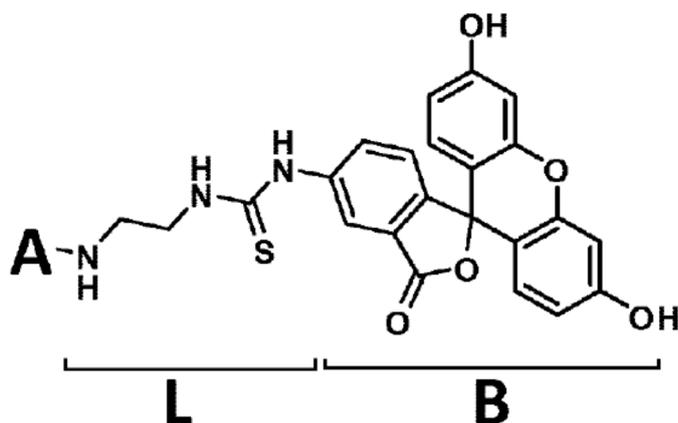
Fórmula (XIIIa).

A de fórmula XIIIa puede ser



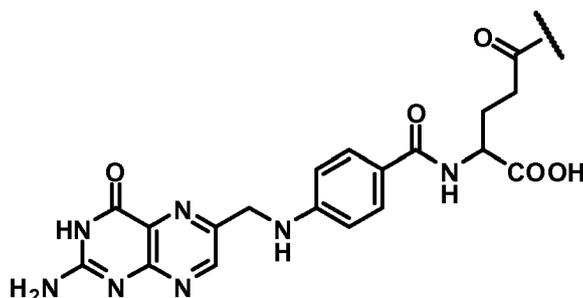
La fórmula XIII puede ser de fórmula XIIIb:

20



Fórmula (XIIIb).

A puede ser



5

Se da a conocer en el presente documento un producto intermedio de interruptor para activar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC), comprendiendo el producto intermedio de interruptor: (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende una molécula pequeña, en el que el CAR-ID interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (b) un ligador conectado al CAR-ID, en el que el ligador no comprende una región que interacciona con la CAR-EC y el ligador no comprende una región que interacciona con una molécula de superficie en una célula diana. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede ser un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender un grupo aminoóxilo, grupo azida, grupo ciclooctino, o una combinación de los mismos en uno o más extremos terminales. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol. El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser un 1,2,3-triazol o un 1,2,4-triazol. El CAR-ID puede comprender isotiocianato de fluoresceína (FITC). El CAR-ID puede comprender biotina. El CAR-ID puede comprender dinitrofenol.

Se da a conocer en el presente documento un producto intermedio de interruptor para activar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC), comprendiendo el producto intermedio de interruptor: (a) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural, en el que el TID interacciona con una molécula de superficie en una célula diana; y (b) un ligador conectado al TID, en el que el ligador no comprende una región que interacciona directamente con la CAR-EC y el ligador no comprende una región que interacciona directamente con la célula diana. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender al menos cuatro subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 10 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 20 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 30 subunidades de PEG. El ligador puede comprender una azida en un extremo. El ligador puede comprender un aminoóxilo en un extremo. El ligador puede ser un ligador de azida-PEG-aminoóxilo. El ligador puede estar unido al TID por medio de una ligación de oxima. El TID puede comprender una molécula pequeña. La molécula pequeña puede ser ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. La molécula pequeña puede ser folato o un derivado del mismo. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo anti-CD19. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un dominio variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-CD19. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-BMSA, anti-CEA, anti-CLL1, anti-CS1, anti-EGFR y anti-Her2. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un dominio variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-BMSA, anti-

40

CEA, anti-CLL1, anti-CS1, anti-EGFR y anti-Her2. El TID puede estar codificado por un nucleótido de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El TID puede comprender un polipéptido de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender un aminoácido no natural. El aminoácido no natural puede ser p-acetilfenilalanina (pAcF). El aminoácido no natural puede ser p-azidofenilalanina (pAzF).

Se dan a conocer además en el presente documento métodos de tratamiento de un estado que comprende administrar uno o más interruptores de células efectoras con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) dados a conocer en el presente documento o una composición farmacéutica de los mismos a un sujeto que lo necesita. El método puede comprender además administrar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) al sujeto que lo necesita. El interruptor de CAR-EC y la CAR-EC pueden administrarse simultáneamente. El interruptor de CAR-EC y la CAR-EC pueden administrarse secuencialmente. El CAR puede interactuar con un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) del interruptor de CAR-EC. El CAR-ID puede comprender un derivado de fluoresceína o el derivado de biotina. El interruptor de CAR-EC puede comprender un dominio de interacción con la diana (TID). El TID puede comprender una molécula pequeña. La molécula pequeña puede ser ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. La molécula pequeña puede ser folato o un derivado del mismo. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo anti-CD19. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un dominio variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-CD19. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-BMSA, anti-CEA, anti-CLL1, anti-CS1, anti-EGFR y anti-Her2. El TID puede basarse en o derivarse de al menos una porción de un dominio variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-BMSA, anti-CEA, anti-CLL1, anti-CS1, anti-EGFR y anti-Her2. El TID puede estar codificado por un nucleótido de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El TID puede comprender un polipéptido de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender un aminoácido no natural. El aminoácido no natural puede ser p-acetilfenilalanina (pAcF). El aminoácido no natural puede ser p-azidofenilalanina (pAzF). El interruptor puede comprender además un ligador. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender al menos cuatro subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 10 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 20 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 30 subunidades de PEG. El ligador puede comprender una azida en un extremo. El ligador puede comprender un aminoóxido en un extremo. El ligador puede ser un ligador de azida-PEG-aminoóxido. El CAR puede comprender un anticuerpo anti-FITC o fragmento del mismo. El estado puede ser un cáncer.

Se dan a conocer en el presente documento métodos de tratamiento de una enfermedad o estado que comprenden administrar un primer interruptor de célula efectora con antígeno quimérico (CAR-EC) que comprende un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) y un dominio de interacción con la diana (TID) a un sujeto que lo necesita. El método puede comprender además administrar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que une al CAR-ID del interruptor de CAR-EC al sujeto. El interruptor de CAR-EC y la CAR-EC pueden administrarse simultáneamente. El interruptor de CAR-EC y la CAR-EC pueden administrarse secuencialmente. El método puede comprender además administrar un segundo interruptor de CAR-EC. El primer interruptor de CAR-EC puede unirse a una primera molécula de superficie en una primera diana y el segundo interruptor de CAR-EC puede unirse a una segunda molécula de superficie en una segunda diana. El primer interruptor y el segundo interruptor pueden administrarse simultáneamente. El primer interruptor y el segundo interruptor pueden administrarse secuencialmente. La primera molécula de superficie y la segunda molécula de superficie pueden ser iguales. La primera diana y la segunda diana pueden ser diferentes. La primera diana y la segunda diana pueden ser iguales. La primera molécula de superficie y la segunda molécula de superficie pueden estar en dianas diferentes. La primera molécula de superficie y la segunda molécula de superficie pueden ser la misma diana. El primer interruptor de CAR-EC y el segundo interruptor de CAR-EC pueden unirse al mismo receptor de antígeno quimérico (CAR) en una CAR-EC. El método puede comprender además administrar una o más CAR-EC adicionales. Las CAR-EC pueden ser iguales. Las CAR-EC pueden ser diferentes. La CAR-EC puede seleccionarse de una célula T, una célula B efectora, una célula citolítica natural, un macrófago y un progenitor de los mismos. La CAR-EC puede ser una célula T. La célula T puede seleccionarse de una célula T sin tratamiento previo, una célula de célula T madre de memoria, una célula T de memoria central, una célula T de memoria efectora, una célula T

auxiliar, una célula T CD4+, una célula T CD8+, una célula T CD8/CD4+, una célula T $\alpha\beta$, una célula T $\gamma\delta$, una célula T citotóxica, una célula T citolítica natural, una célula citolítica natural, un macrófago. El CAR de la CAR-EC puede comprender un anticuerpo o fragmento del mismo. El anticuerpo puede comprender un anticuerpo anti-FITC o fragmento del mismo. El fragmento del mismo puede ser un scFv. El CAR de la CAR-EC puede estar codificado por uno o más polinucleótidos seleccionados de SEQ ID NO: 1-4. El CAR puede estar codificado por un polinucleótido que es al menos aproximadamente el 70% idéntico a uno o más polinucleótidos seleccionados de SEQ ID NO: 1-4. El estado puede ser un cáncer. El cáncer puede seleccionarse de un cáncer con recidiva, un cáncer refractario, un glioblastoma, un cáncer de ovario, un cáncer de próstata, un cáncer de próstata refractario a hormonas y un cáncer de mama. El cáncer puede comprender un tumor seleccionado de un tumor líquido o un tumor sólido. El cáncer puede comprender un tumor heterogéneo. El cáncer puede ser un tumor maligno hematológico. El tumor maligno hematológico puede seleccionarse de leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, un linfoma de células del manto, una leucemia prolinfocítica de células B, un linfoma de células grandes difuso, un linfoma folicular y mieloma múltiple. El tumor maligno hematológico puede ser un tumor maligno de células B. El tumor maligno hematológico puede ser un tumor maligno hematológico positivo para CD19. El estado puede ser una infección.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un ejemplo no limitativo de una plataforma de CAR-EC conmutable basada en FITC.

La figura 2A muestra un esquema de un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un Fab anti-CD 19 con ejemplos no limitativos de sitios de aminoácidos naturales que pueden reemplazarse por el aminoácido no natural p-acetilfenilalanina (pAcF). HC indica cadena pesada y LC indica cadena ligera.

La figura 2B muestra una reacción de conjugación de dos etapas que consiste en una reacción de oxima seguida por una reacción "click" en la que se usa una cetona de un residuo de p-acetilfenilalanina (pAcF) como asa química para modificar la proteína con un ligador de N3-TEG-ONH₂ heterobifuncional. En este esquema, FITC se modifica con un ligador que termina en un ciclooctino, que puede unirse mediante química "click" a la proteína modificada.

La figura 3 muestra los resultados de los ensayos de citotoxicidad de FITC-CAR-EC a razones de E:T de 10:1 y 24 horas de incubación. La figura 3A muestra la citotoxicidad de 4 constructos de FITC-CAR-EC contra células IM-9 con un interruptor de FITC anti-CD19 conjugado en LC S202. La figura 3B muestra la citotoxicidad de 4 constructos de FITC-CAR-EC contra células K562 con un interruptor de FITC anti-CD19 conjugado en LC S202. La figura 3C muestra la citotoxicidad de FITC-CAR-EC 4M5.3 contra células IM-9 con interruptores de FITC conjugados en HC K136, LC S202, ambos o conjugación inespecífica (por ejemplo, al azar). La figura 3D muestra la citotoxicidad de FITC-CAR-EC 4M5.3 contra células SKBR3 con un interruptor de Her2 conjugado en LC S202 o de manera inespecífica (por ejemplo, al azar). LC indica cadena ligera.

La figura 4A muestra un esquema de la conjugación por medio de p-azidofenilalanina (pAzF). El aminoácido no natural pAzF se incorpora en anti-CD19 para producir un sustrato proteínogénico para la conjugación "click" de una sola etapa con una molécula de FITC modificada con un ligador de ciclooctino.

La figura 4B muestra un diagrama de flujo para someter a prueba la eficacia de los CAR-EC en tres modelos de ratón.

La figura 5A representa la estructura del ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico y FITC unidos mediante un ligador de TriA.

La figura 5B representa el esquema de síntesis del interruptor de CAR-EC de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico-TriA-FITC.

La figura 5C muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad de 24 h de células anti-FITC-CAR T que seleccionan como diana células de cáncer de próstata C4-2 (PSMA+) con diluciones en serie de P-TriA-FITC. Cada concentración se llevó a cabo por triplicado. Los resultados se muestran como porcentaje promedio de citotoxicidad.

La figura 6A representa la estructura del interruptor de folato-FITC.

Las figuras 6B-C muestran los resultados de un ensayo de citotoxicidad *in vitro* de anti-FITC-CAR-EC incubados conjuntamente con células dianas KB (FR+) (figura 6B) o A549 (FR-) (figura 6C) en presencia de concentraciones variables de un interruptor de folato-FITC. Cada concentración se llevó a cabo por triplicado. Los resultados se muestran como porcentaje promedio de citotoxicidad.

La figura 7 representa el antagonista de CCK2R Z360.

La figura 8 representa [D-Lys6]-LHRH, una versión proteolíticamente estable de LHRH natural (hormona liberadora de hormona luteinizante).

La figura 9A representa sitios de mutación en un anticuerpo anti-CD19 para la incorporación de p-azidofenilalanina

(pAzF) para producir un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural.

La figura 9B representa una conjugación de una etapa, específica de sitio de un producto intermedio de FITC-ligador con diversos dominios de interacción con la diana que comprenden Fab mutados por medio de una reacción "click".

Las figuras 10A-N muestran exploraciones de ESI-EM de interruptores de FITC-anticuerpo anti-CD19.

La figura 11 muestra la cromatografía de exclusión molecular de SDS-PAGE de interruptores de FITC-anticuerpo anti-CD19.

La figura 12 muestra la citotoxicidad de interruptores de FITC-anticuerpo anti-CD19 tal como se mide mediante citometría de flujo.

La figura 13 muestra la regresión de tumores positivos para PSMA en ratones tratados con interruptores basados en P-TriA-FITC y células anti-FITC-CART.

Las figuras 14A-I muestran un esquema de interruptores a modo de ejemplo.

Las figuras 15A-H muestran un esquema de productos intermedios de interruptores a modo de ejemplo.

La figura 16 muestra un esquema a modo de ejemplo de la producción de un interruptor.

Las figuras 17A-C muestran esquemas de reguladores de CAR-EC y las CAR-EC.

La figura 18 representa ligadores a modo de ejemplo.

La figura 19 representa ligadores heterobifuncionales.

La figura 20 muestra un esquema general para sintetizar ligadores bifuncionales.

La figura 21 muestra conjugados de FITC-anticuerpo anti-CD19 purificados mediante cromatografía de exclusión molecular y caracterizados mediante SDS-PAGE.

La figura 22 muestra ESI-EM para conjugados de FITC-anticuerpo anti-CD19.

Descripción detallada de la invención

Las terapias con CAR-T actuales padecen métodos engorrosos y riesgos de seguridad inaceptables. Estas importantes limitaciones son a menudo el resultado de métodos insuficientes para controlar la actividad de CAR-T. Por ejemplo, las terapias con CAR-T anti-CD19 actuales dan como resultado aplasia de células B persistente. La introducción de un interruptor que controla la actividad de los CAR-T permitiría que la respuesta se apague tras eliminarse las células neoplásicas y permitiría que las células B volvieran a proliferar. Estudios preclínicos recientes han demostrado que los sistemas de CAR-T pueden controlarse a través de un interruptor basado en anticuerpo, en el que el anticuerpo se une a la célula diana (por ejemplo, célula cancerosa), lo que permite que la actividad se apague. Aunque estos sistemas permiten conceptualmente la selección como diana conmutable de tumores usando CAR-T, padecen una serie de limitaciones, tales como marcaje inespecífico de anticuerpos. El marcaje inespecífico de anticuerpos usando cisteínas o lisinas produce a menudo productos heterogéneos que incluyen variantes que pueden ser no funcionales, tener farmacocinética alterada, potencialmente inmunogénicas y/o difíciles de optimizar. Además, los interruptores basados en anticuerpos que comprenden múltiples regiones de unión a CAR-T en un único anticuerpo producen un sustrato multivalente para la célula T que puede provocar activación inespecífica.

La inmunogenicidad del receptor de antígeno quimérico (CAR) es también un problema. Por ejemplo, la expresión de algunas proteínas foráneas (por ejemplo, avidina) en la superficie de células CAR-T puede activar una respuesta inmunitaria no deseada. Además, la transducción de señales por el CAR puede optimizarse para producir el mayor efecto deseado sobre la diana (por ejemplo, célula cancerosa).

El desarrollo de interruptores de células CAR-T homogéneos con geometría precisa, actividad controlada y especificidad puede ser crítica para desarrollar una terapia con CAR-T que tenga la potencia y persistencia necesarias para erradicar tumores malignos al tiempo que se mantiene un tratamiento seguro, controlable. Las composiciones, los métodos, las plataformas y los kits dados a conocer en el presente documento abordan estas necesidades.

Se dan a conocer en el presente documento interruptores para su uso en la regulación de la actividad de una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC). Generalmente, el interruptor comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID); y (b) un dominio de interacción con la diana (TID). El interruptor puede comprender además uno o más ligadores. El TID puede basarse en o derivarse de un polipéptido. El polipéptido puede modificarse para comprender uno o más aminoácidos no naturales. El TID puede comprender

una molécula pequeña. En algunos casos, el TID no comprende dos o más aminoácidos conectados por un enlace amida. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. En algunos casos, el CAR-ID no comprende dos o más aminoácidos conectados por un enlace amida.

5 Se dan a conocer en el presente documento interruptores para regular la actividad de una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC), comprendiendo el interruptor (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural, en el que el TID interacciona con una molécula de superficie en una célula diana.

10 Se dan a conocer en el presente documento interruptores para regular la actividad de una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC), comprendiendo el interruptor: (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que interacciona con una molécula de superficie en una célula diana, en el que el CAR-ID y el TID no comprenden dos o más aminoácidos conectados por un enlace amida.

15 Se dan a conocer en el presente documento células efectoras que expresan receptores de antígenos quiméricos (CAR-EC) e interruptores de células efectoras que expresan receptores de antígenos quiméricos (interruptores de CAR-EC) útiles para el tratamiento de una variedad de enfermedades y estados. El interruptor de CAR-EC puede comprender (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende una molécula pequeña; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender un fragmento de unión a anticuerpo (fragmento Fab) o un anticuerpo de longitud completa.

20 Se dan a conocer además en el presente documento interruptores de CAR-EC que comprenden (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende una primera molécula pequeña; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende una segunda molécula pequeña.

25 Se dan a conocer en el presente documento composiciones que comprenden una pluralidad de interruptores para regular la actividad de una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC), en las que un interruptor de la pluralidad de interruptores comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que interacciona con una molécula de superficie en una célula diana, en las que al menos aproximadamente el 60% de los interruptores son estructuralmente homólogos.

30 Se dan a conocer en el presente documento composiciones que comprenden una pluralidad de interruptores para regular la actividad de una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC), en las que un interruptor de la pluralidad de interruptores comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un polipéptido, en la que el CAR-ID se une al mismo residuo de aminoácido del TID en al menos el 60% de los interruptores.

35 Los métodos de producción de los interruptores y productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden proporcionar ventajosamente el control de la actividad de células CAR-EC, titulación de la reactividad fuera de diana, la supresión del síndrome de lisis tumoral (TLS), la atenuación del síndrome de liberación de citocinas (CRS) y/o la optimización de la unión al interruptor de CAR-EC mediante afinidad, valencia, geometría, longitud del ligador y/o química del ligador a través de conjugación específica de sitio de componentes/regiones de interruptores de CAR-EC.

40 Se dan a conocer en el presente documento métodos de producción de un interruptor para regular la actividad de una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC). El método puede comprender (a) obtener un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural; y (b) unir un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) al TID, produciendo de ese modo el interruptor.

45 Se dan a conocer además en el presente documento métodos de producción de un interruptor para regular la actividad de una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) que comprende (a) poner en contacto un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) con un dominio de interacción con la diana (TID); y (b) producir el interruptor uniendo el CAR-ID a un sitio predeterminado en el TID.

50 Se dan a conocer además en el presente documento métodos de producción de un interruptor para regular la actividad de una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) que comprende (a) poner en contacto una pluralidad de dominios de interacción con receptores de antígenos quiméricos (CAR-ID) con una pluralidad de dominios de interacción con la diana (TID); y (b) unir uno o más CAR-ID de la pluralidad de CAR-ID a uno o más TID de la pluralidad de TID, produciendo de ese modo una pluralidad de interruptores, en los que al menos aproximadamente el 60% de los interruptores son estructuralmente homólogos.

60 Se dan a conocer además en el presente documento métodos de producción de un interruptor para regular la actividad de una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) que comprende (a) poner en contacto una pluralidad de dominios de interacción con receptores de antígenos quiméricos (CAR-ID) con una pluralidad de dominios de interacción con la diana (TID); y (b) unir uno o más CAR-ID de la pluralidad de CAR-ID a uno o más TID de la pluralidad de TID, produciendo de ese modo una pluralidad de interruptores, en los que al menos aproximadamente el 60% de los interruptores son estructuralmente homólogos.

65

Se dan a conocer además en el presente documento métodos de producción de un interruptor para regular la actividad de una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) que comprende (a) poner en contacto una pluralidad de dominios de interacción con receptores de antígenos quiméricos (CAR-ID) con una pluralidad de dominios de interacción con la diana (TID); y (b) unir un CAR-ID de la pluralidad de CAR-ID a un TID de la pluralidad de TID, produciendo de ese modo una pluralidad de interruptores, en los que el CAR-ID se une al mismo residuo de aminoácido del TID en al menos el 60% de los interruptores.

Se dan a conocer además en el presente documento métodos de producción de un interruptor de fórmula IV: X-L1-L2-Y o fórmula IVA: Y-L2-L1-X que comprenden (a) acoplar L1 a X para producir un primer producto intermedio de fórmula IIA: L1-X, en la que: i. X comprende un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en una célula efectora; y ii. L1 comprende un primer ligador antes de acoplarse a X; (b) acoplar L2 a Y para producir un segundo producto intermedio de fórmula VA: Y-L2, en la que: i. Y comprende un dominio de interacción con la diana (TID) que interacciona con una molécula de superficie en una célula diana; y ii. L2 comprende un segundo ligador antes de acoplarse a X; y (c) unir el primer producto intermedio al segundo producto intermedio, produciendo de ese modo el interruptor de fórmula IV (X-L1-L2-Y) o fórmula IVA (Y-L2-L1-X).

Se dan a conocer en el presente documento productos intermedios de interruptores. El producto intermedio de interruptor puede comprender (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende una molécula pequeña, en el que el CAR-ID interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (b) un ligador conectado al CAR-ID, en el que el ligador no comprende una región que interacciona con la CAR-EC y el ligador no comprende una región que interacciona con una molécula de superficie en una célula diana.

Se da a conocer además en el presente documento un producto intermedio de interruptor que comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende una molécula pequeña, en el que el CAR-ID interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (b) un ligador conectado al CAR-ID, en el que el ligador comprende un grupo aminoóxilo, grupo azida y/o grupo ciclooctino en uno o más extremos terminales.

Se da a conocer además en el presente documento un producto intermedio de interruptor que comprende (a) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural, en el que el TID interacciona con una molécula de superficie en una célula diana; y (b) un ligador conectado al TID, en el que el ligador no comprende una región que interacciona directamente con la CAR-EC y el ligador no comprende una región que interacciona directamente con la célula diana.

Se da a conocer además en el presente documento un producto intermedio de interruptor que comprende (a) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un polipéptido o una molécula pequeña, en el que el TID interacciona con una molécula de superficie en una célula diana; y (b) un ligador conectado al TID, en el que el ligador comprende un grupo aminoóxilo, grupo azida y/o grupo ciclooctino en uno o más extremos terminales.

Se dan a conocer además en el presente documento métodos de producción de un producto intermedio de interruptor para regular la actividad de una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) que comprende (a) poner en contacto un dominio de interacción con la diana (TID) con un ligador, comprendiendo el ligador un grupo aminoóxilo, grupo azida y/o grupo ciclooctino en uno o más extremos terminales; y (b) unir el ligador al TID, produciendo de ese modo el producto intermedio de interruptor.

Se dan a conocer además en el presente documento métodos de producción de un producto intermedio de interruptor para regular la actividad de una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) que comprende (a) poner en contacto un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) con un ligador, comprendiendo el ligador un grupo aminoóxilo, grupo azida y/o grupo ciclooctino en uno o más extremos terminales; y (b) unir el ligador al CAR-ID, produciendo de ese modo el producto intermedio de interruptor.

Se dan a conocer además en el presente documento plataformas universales de células efectoras con receptores de antígenos quiméricos (CAR-EC). Las plataformas de CAR-EC pueden comprender uno o más interruptores de CAR-EC, las CAR-EC, productos intermedios de CAR-EC y ligadores. La CAR-EC puede comprender un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de afinidad ultra alta (por ejemplo, scFv) por el interruptor.

Se dan a conocer además en el presente documento métodos de tratamiento de una enfermedad o estado que comprende administrar un interruptor de CAR-EC a un sujeto que lo necesita. El método puede comprender además administrar una CAR-EC al sujeto que lo necesita. El interruptor de CAR-EC puede proporcionar una respuesta titulable, seguridad y/o cese mejorados de la actividad de células CAR-EC controlando la administración del interruptor. En contraposición a enfoques previos en el control de la actividad de células CAR-T, que "apagan" la actividad de CAR-T, los interruptores de CAR-EC dados a conocer en el presente documento funcionan generalmente como activadores de CAR-EC o interruptores "de encendido".

Se dan a conocer en el presente documento métodos de tratamiento de una enfermedad o estado en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto un interruptor que comprende: (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural, en el que el TID interacciona con una molécula de superficie en una célula diana.

Se dan a conocer además en el presente documento usos de un interruptor en la fabricación de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un sujeto con cáncer, comprendiendo el interruptor: (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural, en el que el TID interacciona con una molécula de superficie en una célula diana.

Se proporcionan métodos, kits y composiciones para producir plataformas de CAR-EC, interruptores de CAR-EC y las CAR-EC. Los métodos, kits y composiciones dados a conocer en el presente documento pueden usarse para activar una célula efectora. Por ejemplo, el dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) de un interruptor de CAR-EC puede interaccionar con un receptor de antígeno quimérico (CAR) en una célula efectora y el dominio de interacción con la diana (TID) del interruptor de CAR puede interaccionar con una molécula de superficie en una diana, activando de ese modo la célula efectora y dirigiendo la actividad de la célula efectora a la diana. Estos métodos, kits y composiciones pueden encontrar uso terapéutico en varias enfermedades. La plataforma de CAR-EC puede usarse para producir una variedad de interruptores de CAR-EC con diferentes longitudes, valencias, orientaciones, ligadores, CAR-ID y TID. La variabilidad de los interruptores de CAR-EC puede proporcionar la optimización de los interruptores de CAR-EC en el tratamiento de una variedad de enfermedades y estados. Por ejemplo, tumores heterogéneos y tumores malignos de células sanguíneas (por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda y leucemia linfocítica crónica) pueden tratarse más eficazmente con una CAR-EC e interruptor de CAR-EC que se ha optimizado para dianas particulares. También pueden tratarse más eficazmente tumores heterogéneos con múltiples interruptores de CAR-EC que seleccionan como diana más de un antígeno tumoral. A diferencia de la terapia con CAR-EC previamente observada, la presente invención proporciona muchas, si no todas, de tales optimizaciones. Estos y otros objetos, ventajas y características de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de los detalles de las composiciones, métodos y kits tal como se describen más completamente a continuación.

A menos que se especifique otra cosa, los términos "interruptor" e "interruptor de CAR-EC", tal como se usa en el presente documento, se usan de manera intercambiable y pueden referirse a un interruptor de molécula pequeña-anticuerpo, un interruptor de hapteno-anticuerpo y/o un interruptor de molécula pequeña. La porción de anticuerpo del interruptor de hapteno-anticuerpo o interruptor de hapteno-molécula pequeña puede comprender al menos una porción de un anticuerpo o un anticuerpo entero. Por ejemplo, la porción de anticuerpo del interruptor de hapteno-anticuerpo puede comprender al menos una porción de una cadena pesada, una porción de una cadena ligera, una porción de una región variable, una porción de una región constante, una porción de una región determinante de complementariedad (CDR), o una combinación de las mismas. La porción de anticuerpo del interruptor de molécula pequeña-anticuerpo y/o interruptor de hapteno-anticuerpo puede comprender al menos una porción de la región Fc (fragmento, cristalizable). La porción de anticuerpo del interruptor de molécula pequeña-anticuerpo y/o interruptor de hapteno-anticuerpo puede comprender al menos una porción de la región determinante de complementariedad (por ejemplo, CDR1, CDR2, CDR3). La porción de anticuerpo del anticuerpo de molécula pequeña-anticuerpo y/o interruptor de hapteno-anticuerpo puede comprender al menos una porción de la región Fab (fragmento, unión a antígeno). El interruptor de hapteno-anticuerpo puede ser un interruptor de hapteno-Fab.

Antes de que los presentes métodos, kits y composiciones se describan en mayor detalle, ha de entenderse que esta invención no se limita a un método, kit o composición particular descrito, ya que tales pueden variar, por supuesto. Ha de entenderse también que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir realizaciones particulares solo, y no se pretende que sea limitativa, ya que el alcance de la presente invención sólo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas. Se exponen ejemplos para proporcionar a los expertos habituales en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo realizar y usar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni pretenden representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero algunos errores experimentales y desviaciones deben tenerse en cuenta. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados y la presión es a o casi la atmosférica.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que también da a conocer específicamente cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente otra cosa, entre los límites superior e inferior de ese intervalo. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor establecido o valor intermedio en un intervalo establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido se abarca dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo, y cada intervalo en donde se incluyen cualquiera, ninguno o ambos límites en los intervalos más pequeños también se abarca dentro de la invención, sujeto cualquier límite excluido específicamente en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, también se

incluyen en la invención intervalos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la presente invención, se describen ahora algunos materiales y métodos posibles y preferidos.

Debe indicarse que, tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “una célula” incluye una pluralidad de tales células y la referencia a “el péptido” incluye la referencia a uno o más péptidos y equivalentes de los mismos, por ejemplo, polipéptidos, conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Las publicaciones comentadas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento ha de interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a tal publicación en virtud de invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar que se confirmen independientemente.

Aunque en el presente documento se han mostrado y descrito realizaciones preferidas de la presente invención, resultará obvio para los expertos en la técnica que tales realizaciones se proporcionan a modo de ejemplo sólo. Numerosas variaciones, cambios y sustituciones se les ocurrirán a los expertos en la técnica sin apartarse de la invención. Debe entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las realizaciones de la invención descritas en el presente documento en la puesta en práctica de la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes estén cubiertos de ese modo.

Interruptores de CAR-EC

Se dan a conocer en el presente documento interruptores (por ejemplo, interruptores de células efectoras con receptores de antígenos quiméricos, interruptores de CAR-EC), métodos de producción de tales interruptores y usos de los mismos. Generalmente, un interruptor puede comprender (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID); y (b) un dominio de interacción con la diana (TID). El interruptor puede comprender además uno o más CAR-ID adicionales. El interruptor puede comprender además uno o más TID adicionales. El interruptor puede comprender además uno o más ligadores. Las figuras 14A-I representan interruptores a modo de ejemplo. Tal como se muestra en la figura 14A, un interruptor puede comprender un CAR-ID (1401) unido a un TID (1405). Tal como se muestra en la figura 14B, un interruptor puede comprender un CAR-ID (1401), un ligador (1410) y un TID (1405). El ligador (1410) puede unir el CAR-ID (1401) al TID (1405). Tal como se muestra en la figura 14C, un interruptor puede comprender un CAR-ID (1401), un primer ligador (1415), un segundo ligador (1410) y un TID (1405). El primer ligador (1415) y el segundo ligador (1410) pueden estar conectados entre sí. Además, el primer ligador (1415) puede unirse al CAR-ID (1401) y el segundo ligador (1410) puede unirse al TID (1405), dando como resultado de ese modo la unión del CAR-ID (1401) al TID (1405). El primer ligador (1410) y el segundo ligador (1415) pueden ser iguales. El primer ligador (1410) y el segundo ligador (1415) pueden ser diferentes.

El interruptor puede comprender un CAR-ID y dos o más TID. Tal como se muestra en la figura 14D, un interruptor puede comprender un CAR-ID (1401), un primer TID (1405) y un segundo TID (1420). El primer TID (1405) y el segundo TID (1420) pueden unirse al CAR-ID (1401). Tal como se muestra en la figura 14E, un interruptor puede comprender un CAR-ID (1401), un ligador (1410), un primer TID (1405) y un segundo TID (1420). El ligador (1410) puede unir el primer TID (1405) al CAR-ID (1401). El segundo TID (1420) puede unirse al CAR-ID (1401). Tal como se muestra en la figura 14F, un interruptor puede comprender un CAR-ID (1401), un primer ligador (1410), un segundo ligador (1415), un primer TID (1405) y un segundo TID (1420). El primer ligador (1410) puede unir el primer TID (1405) al CAR-ID (1401). El segundo ligador (1415) puede unir el segundo TID (1420) al CAR-ID (1401). El primer TID (1405) y un segundo TID (1420) pueden ser iguales. El primer TID (1405) y un segundo TID (1420) pueden ser diferentes. El primer ligador (1410) y el segundo ligador (1415) pueden ser iguales. El primer ligador (1410) y el segundo ligador (1415) pueden ser diferentes. El interruptor puede comprender además uno o más CAR-ID adicionales. El interruptor puede comprender además uno o más TID adicionales. El interruptor puede comprender además uno o más ligadores.

El interruptor puede comprender un TID y dos o más CAR-ID. Tal como se muestra en la figura 14G, un interruptor puede comprender un TID (1405), un primer CAR-ID (1401) y un segundo CAR-ID (1425). El primer CAR-ID (1401) y el segundo CAR-ID (1425) pueden unirse al TID (1405). Tal como se muestra en la figura 14H, un interruptor puede comprender un TID (1405), un ligador (1410), un primer CAR-ID (1401) y un segundo CAR-ID (1425). El ligador (1410) puede unir el primer CAR-ID (1401) al TID (1405). El segundo CAR-ID (1425) puede unirse al TID (1405). Tal como se muestra en la figura 14I, un interruptor puede comprender un TID (1405), un primer ligador (1410), un segundo ligador (1415), un primer CAR-ID (1401) y un segundo CAR-ID (1425). El primer ligador (1410) puede unir el primer CAR-ID (1401) al TID (1405). El segundo ligador (1415) puede unir el segundo CAR-ID (1425) al TID (1405). El primer

CAR-ID (1401) y el segundo CAR-ID (1425) pueden ser iguales. El primer CAR-ID (1401) y el segundo CAR-ID (1425) pueden ser diferentes. El primer ligador (1410) y el segundo ligador (1415) pueden ser iguales. El primer ligador (1410) y el segundo ligador (1415) pueden ser diferentes. El interruptor puede comprender además uno o más CAR-ID adicionales. El interruptor puede comprender además uno o más TID adicionales. El interruptor puede comprender además uno o más ligadores.

El CAR-ID puede unirse al TID. La unión del CAR-ID al TID puede producirse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el CAR-ID puede unirse al TID mediante fusión, inserción, injerto o conjugación. El CAR-ID puede fusionarse al TID. El CAR-ID puede insertarse en el TID. El CAR-ID puede conjugarse con el TID.

Un interruptor puede comprender (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID); y (b) un dominio de interacción con la diana (TID). El CAR-ID puede comprender isotiocianato de fluoresceína (FITC). El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico, folato o un derivado del mismo. Interruptores que comprenden un CAR-ID que comprende un hapteno y un TID que comprende una molécula pequeña pueden denominarse interruptores de hapteno-molécula pequeña.

Un interruptor puede comprender un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID); y (b) un dominio de interacción con la diana (TID). El CAR-ID puede interactuar con un receptor de antígeno quimérico (CAR) en una célula efectora. El TID puede interactuar con una molécula de superficie en una diana. El TID puede comprender un aminoácido no natural. Un TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede modificarse para contener uno o más aminoácidos no naturales. El CAR-ID puede unirse al TID. El CAR-ID puede unirse de manera específica de sitio al TID. El CAR-ID puede unirse de manera específica de sitio al aminoácido no natural en el TID. Interruptores que comprenden un CAR-ID que comprende una molécula pequeña y un TID que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo pueden denominarse interruptores de molécula pequeña-anticuerpo.

Un interruptor puede comprender (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende FITC o un derivado del mismo; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID). El TID puede basarse en o derivarse de una cadena pesada de un anticuerpo. El TID puede basarse en o derivarse de una cadena ligera de un anticuerpo. El TID puede basarse en o derivarse de un Fab de un anticuerpo. El TID puede comprender un anticuerpo anti-CD 19 o un fragmento del mismo. El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-Her2 o un fragmento del mismo. El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-CS1 o un fragmento del mismo. El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-BCMA o un fragmento del mismo. El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-EGFRVIII o un fragmento del mismo. El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1, un anticuerpo anti-CD33 o un fragmento del mismo, o una combinación de los mismos. El TID puede ser un Fab anti-CD19. El TID puede ser un Fab anti-CD22. El TID puede ser un Fab anti-Her2. El TID puede ser un Fab anti-CS1. El TID puede ser un Fab anti-BCMA. El TID puede ser un Fab anti-EGFRVIII. El TID puede basarse en o derivarse de un Fab seleccionado de un Fab anti-CD20, un Fab anti-EGFR, un Fab anti-CEA, un Fab anti-CLL-1, un Fab anti-CD33, o una combinación de los mismos. El CAR-ID puede unirse al TID. El CAR-ID puede unirse de manera específica de sitio al TID. El CAR-ID puede fusionarse al TID. El CAR-ID puede insertarse en el TID. El TID puede insertarse en el CAR-ID. El interruptor de CAR-EC puede comprender además uno o más ligadores. El uno o más ligadores puede unir el CAR-ID al TID. El interruptor de CAR-EC puede comprender además uno o más aminoácidos no naturales. El CAR-ID puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El TID puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El CAR-ID y el TID puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El CAR-ID puede unirse al TID por medio del uno o más aminoácidos no naturales en el CAR-ID. El CAR-ID puede unirse al TID por medio del uno o más aminoácidos no naturales en el TID. El CAR-ID puede unirse al TID por medio del uno o más aminoácidos no naturales en el CAR-ID y uno o más aminoácidos no naturales en el TID.

Un interruptor puede comprender (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID); y un dominio de interacción con la diana (TID), en el que el CAR-ID y el TID no comprenden dos o más aminoácidos unidos por un enlace amida. El CAR-ID puede comprender una primera molécula pequeña. El TID puede comprender una segunda molécula pequeña. La primera molécula pequeña y la segunda molécula pequeña pueden ser diferentes. El interruptor puede comprender además uno o más ligadores. El interruptor puede comprender además uno o más CAR-ID adicionales. El interruptor puede comprender además uno o más TID adicionales. El CAR-ID puede comprender un aminoácido. El CAR-ID puede comprender aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente cinco aminoácidos. El CAR-ID puede comprender dos o más aminoácidos. Los dos o más aminoácidos pueden estar adyacentes entre sí. Los dos o más aminoácidos pueden estar conectados entre sí. Los dos o más aminoácidos pueden no estar adyacentes entre sí. Los dos o más aminoácidos pueden no estar unidos por un enlace amida.

Un interruptor puede comprender (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interactúa con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que interactúa con una molécula de superficie en una célula diana, en el que el CAR-ID y el TID no comprenden dos o más aminoácidos conectados por un enlace amida. El interruptor puede comprender además uno o más CAR-

- ID adicionales. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. El CAR-ID puede seleccionarse del grupo que consiste en DOTA, dinitrofenol, quinona, biotina, anilina, atrazina, un derivado de anilina, ácido o-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido m-aminobenzoico, hidralazina, halotano, digoxigenina, arsonato de benceno, lactosa, trinitrofenol, biotina o un derivado de los mismos. El CAR-ID puede comprender isotiocianato de fluoresceína (FITC).
- 5 El CAR-ID puede comprender biotina. El CAR-ID puede comprender dinitrofenol. El interruptor puede comprender además uno o más TID adicionales. El TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. El TID puede comprender folato o un derivado del mismo. El interruptor puede comprender además un ligador. El interruptor puede comprender además dos o más ligadores. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede ser un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender un grupo aminoóxilo, grupo azida, grupo ciclooctino, o una combinación de los mismos en uno o más extremos terminales. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol. El ligador puede comprender al menos cuatro subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 10 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 20 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 30 subunidades de PEG. El ligador puede comprender una azida en un extremo. El ligador puede comprender un aminoóxilo en un extremo. El ligador puede ser un ligador de azida-PEG-aminoóxilo. El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser un 1,2,3-triazol o un 1,2,4-triazol. El ligador puede ser un ligador de NHS-éster. El ligador puede ser un ligador de TriA.
- 10
- 15
- 20 Un interruptor puede comprender (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende FITC; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que se une a una molécula de superficie que es al menos el 50% homóloga a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado o una versión modificada del mismo. El TID puede unirse a una molécula de superficie que es al menos el 50%, 55%, 57%, 60%, 62%, 65%, 67%, 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97% o aproximadamente el 100% homóloga a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El TID puede unirse a una molécula de superficie que es al menos el 70% homóloga a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El TID puede unirse a una molécula de superficie que es al menos el 80% homóloga a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El TID puede unirse a una molécula de superficie que es al menos el 90% homóloga a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El TID puede unirse a una molécula de superficie que es al menos el 95% homóloga a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA).
- 25
- 30
- 35 Un interruptor puede comprender (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende FITC y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que se une a una diana que es al menos el 50% homóloga a un receptor de folato. El TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede comprender folato o un derivado o una versión modificada del mismo. El TID puede unirse a una molécula de superficie que es aproximadamente el 50%, 55%, 57%, 60%, 62%, 65%, 67%, 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97% o aproximadamente el 100% homóloga a un receptor de folato. El TID puede unirse a una molécula de superficie que es aproximadamente el 70% homóloga a un receptor de folato. El TID puede unirse a una molécula de superficie que es aproximadamente el 80% homóloga a un receptor de folato. El TID puede unirse a una molécula de superficie que es aproximadamente el 90% homóloga a un receptor de folato. El TID puede unirse a una molécula de superficie que es aproximadamente el 95% homóloga a un receptor de folato.
- 40
- 45 El interruptor puede ser menor de aproximadamente 1000 kDa, 1100 kDa, 1200 kDa, 1300 kDa, 1400 kDa, 1500 kDa, 1600 kDa, 1700 kDa, 1800 kDa, 1900, kDa, 2000 kDa, 2100 kDa, 2200 kDa, 2300 kDa, 2400 kDa, 2500 kDa, 2600 kDa, 2700 kDa, 2800 kDa, 2900, kDa o menor de aproximadamente 3000 kDa. El interruptor puede ser menor de aproximadamente 1200 kDa. El interruptor puede ser menor de aproximadamente 1500 kDa. El interruptor de CAR-EC puede ser menor de aproximadamente 2000 kDa.
- 50
- 55 El porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio a un TID puede ser al menos igual al porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera aleatoria al TID. El porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio a un TID puede ser mayor que el porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera aleatoria al TID. El porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio a un TID puede ser al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o el 99% mayor que el porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera aleatoria al TID. El porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio a un TID puede ser al menos aproximadamente el 10% mayor que el porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera aleatoria al TID. El porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio a un TID puede ser al menos aproximadamente el 25% mayor que el porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera aleatoria al TID. El porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio a un TID puede ser al menos aproximadamente el 50% mayor que el porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera aleatoria al TID. El porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio a un TID puede ser al menos aproximadamente el 75% mayor que el porcentaje de
- 60
- 65

citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera aleatoria al TID. El porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio a un TID puede ser al menos aproximadamente el 85% mayor que el porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera aleatoria al TID. El porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio a un TID puede ser al menos aproximadamente el 90% mayor que el porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera aleatoria al TID.

El porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio a un TID puede ser al menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 veces mayor que el porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera aleatoria al TID. El porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio a un TID puede ser al menos aproximadamente 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 veces mayor que el porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera aleatoria al TID. El porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio a un TID puede ser al menos aproximadamente 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 veces mayor que el porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera aleatoria al TID. El porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio a un TID puede ser al menos aproximadamente 2 veces mayor que el porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera aleatoria al TID. El porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio a un TID puede ser al menos aproximadamente 3 veces mayor que el porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera aleatoria al TID. El porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio a un TID puede ser al menos aproximadamente 4 veces mayor que el porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera aleatoria al TID. El porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio a un TID puede ser al menos aproximadamente 5 veces mayor que el porcentaje de citotoxicidad de un interruptor que comprende un CAR-ID unido de manera aleatoria al TID.

Productos intermedios de interruptores

Se dan a conocer en el presente documento productos intermedios de interruptores (por ejemplo, productos intermedios de interruptores de células efectoras con receptores de antígenos quiméricos, productos intermedios de interruptores de CAR-EC), métodos de producción de tales interruptores y usos de los mismos. Generalmente, un producto intermedio de interruptor comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID); y (b) un ligador. El producto intermedio de interruptor puede comprender además uno o más CAR-ID adicionales. El producto intermedio de interruptor puede comprender además uno o más ligadores adicionales. El CAR-ID puede comprender uno o más grupos funcionales. El ligador puede comprender uno o más grupos funcionales. Productos intermedios de interruptores que comprenden un CAR-ID pueden denominarse productos intermedios de interruptores de CAR-ID. El producto intermedio de interruptor puede comprender además uno o más CAR-ID adicionales. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. El CAR-ID puede seleccionarse del grupo que consiste en DOTA, dinitrofenol, quinona, biotina, anilina, atrazina, un derivado de anilina, ácido o-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido m-aminobenzoico, hidralazina, halotano, digoxigenina, arsonato de benceno, lactosa, trinitrofenol, biotina o un derivado de los mismos. El CAR-ID puede comprender isotiocianato de fluoresceína (FITC). El CAR-ID puede comprender biotina. El CAR-ID puede comprender dinitrofenol. El producto intermedio de interruptor puede comprender además uno o más ligadores adicionales. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede ser un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender además una o más subunidades de polietilenglicol. El ligador puede comprender al menos cuatro subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 10 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 20 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 30 subunidades de PEG. El ligador puede comprender una azida en un extremo. El ligador puede comprender un aminoóxido en un extremo. El ligador puede ser un ligador de azida-PEG-aminoóxido. El ligador puede comprender ciclooctino en un extremo. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser un 1,2,3-triazol o un 1,2,4-triazol. El ligador puede ser un ligador de NHS-éster. El ligador puede ser un ligador de TriA. El ligador puede estar unido al CAR-ID mediante ligación de oxima.

Un producto intermedio de interruptor puede comprender (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende una molécula pequeña, en el que el CAR-ID interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (b) un ligador conectado al CAR-ID, en el que el ligador comprende un grupo aminoóxido, grupo azida y/o grupo ciclooctino en uno o más extremos terminales. El producto intermedio de interruptor puede comprender además uno o más CAR-ID adicionales. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. El CAR-ID puede seleccionarse del grupo que consiste en DOTA, dinitrofenol, quinona, biotina, anilina, atrazina, un derivado de anilina, ácido o-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido m-aminobenzoico, hidralazina, halotano, digoxigenina, arsonato de benceno, lactosa, trinitrofenol, biotina o un derivado de los mismos. El CAR-ID puede comprender isotiocianato de fluoresceína (FITC). El CAR-ID puede comprender biotina. El CAR-ID puede comprender dinitrofenol. El producto intermedio de interruptor puede comprender además uno o más ligadores adicionales. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede ser un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender además una o más subunidades de polietilenglicol. El ligador

puede comprender al menos cuatro subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 10 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 20 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 30 subunidades de PEG. El ligador puede comprender una azida en un extremo. El ligador puede comprender un aminoóxido en un extremo. El ligador puede ser un ligador de azida-PEG-aminoóxido. El ligador puede comprender ciclooctino en un extremo. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede estar unido al CAR-ID mediante ligación de oxima.

Alternativa o adicionalmente, un producto intermedio de interruptor puede comprender (a) un dominio de interacción con la diana (TID); y (b) un ligador. El producto intermedio de interruptor puede comprender además uno o más TID adicionales. El producto intermedio de interruptor puede comprender además uno o más ligadores adicionales. El TID puede comprender uno o más grupos funcionales. El ligador puede comprender uno o más grupos funcionales. Productos intermedios de interruptores que comprenden un TID pueden denominarse productos intermedios de interruptores de TID. El producto intermedio de interruptor puede comprender además uno o más TID adicionales. El TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. El TID puede comprender folato o un derivado del mismo. El TID puede comprender un polipéptido basado en o derivado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD19. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-EGFR. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD20. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-Her2. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El anticuerpo puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El producto intermedio de interruptor puede comprender además uno o más ligadores adicionales. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede ser un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender un grupo aminoóxido, grupo azida, grupo ciclooctino, o una combinación de los mismos en uno o más extremos terminales. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol. El ligador puede comprender al menos cuatro subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 10 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 20 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 30 subunidades de PEG. El ligador puede comprender una azida en un extremo. El ligador puede comprender un aminoóxido en un extremo. El ligador puede ser un ligador de azida-PEG-aminoóxido. El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser un 1,2,3-triazol o un 1,2,4-triazol. El ligador puede ser un ligador de NHS-éster. El ligador puede ser un ligador de TriA. El ligador puede estar unido al TID mediante ligación de oxima.

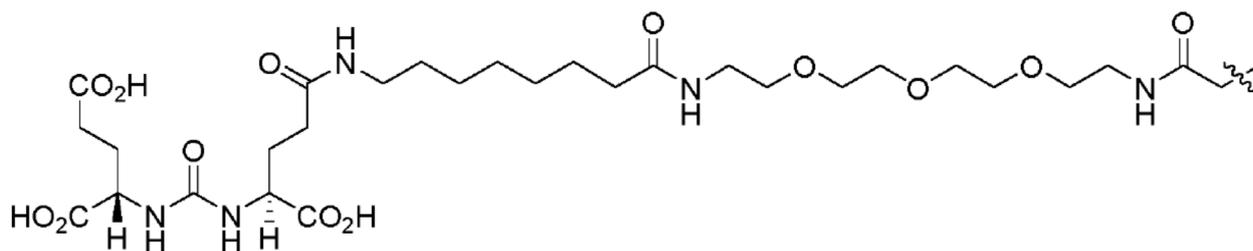
Un producto intermedio de interruptor puede comprender (a) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un polipéptido o una molécula pequeña, en el que el TID interacciona con una molécula de superficie en una célula diana; y (b) un ligador conectado al TID, en el que el ligador comprende un grupo alcoxi-amina (o aminoóxido), grupo azida y/o grupo ciclooctino en uno o más extremos terminales. El producto intermedio de interruptor puede comprender además uno o más TID adicionales. El TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. El TID puede comprender folato o un derivado del mismo. El TID puede comprender un polipéptido basado en o derivado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD19. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-EGFR. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD20. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-Her2. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El anticuerpo puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El producto intermedio de interruptor puede comprender además uno o más ligadores adicionales. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede ser un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender un grupo aminoóxido, grupo azida, grupo ciclooctino, o una combinación de los mismos en uno o más extremos terminales. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol. El ligador puede comprender al menos cuatro subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 10 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 20 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 30 subunidades de PEG. El ligador puede comprender una azida en un extremo. El ligador puede comprender un aminoóxido en un extremo. El ligador puede ser un ligador de azida-PEG-aminoóxido. El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino.

La figura 15A-H representa productos intermedios de interruptores a modo de ejemplo. La figura 15A muestra un producto intermedio de interruptor que comprende un CAR-ID (1505) y un ligador (1510). La figura 15B muestra un producto intermedio de interruptor que comprende un CAR-ID (1505) y un ligador (1520), en el que el ligador

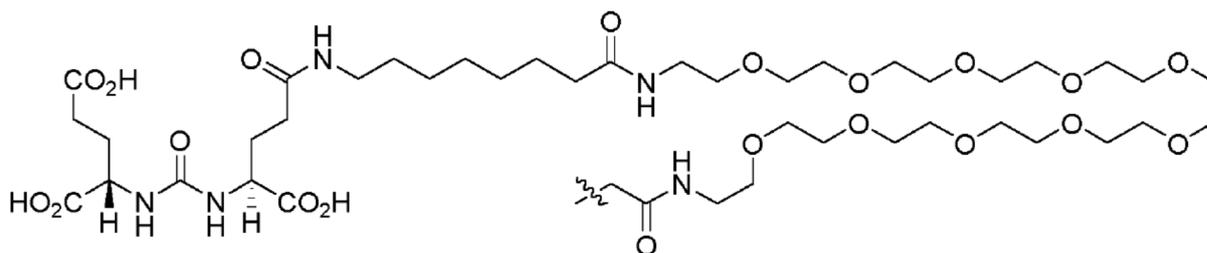
comprende un grupo funcional (1515). La figura 15C muestra un producto intermedio de interruptor que comprende un CAR-ID (1505), un primer ligador (1510) y un segundo ligador (1555). La figura 15D muestra un producto intermedio de interruptor que comprende un CAR-ID (1505), un primer ligador (1520) y un segundo ligador (1555), en el que el primer ligador (1520) comprende un grupo funcional (1515). La figura 15E muestra un producto intermedio de interruptor que comprende un TID (1535) y un ligador (1540). La figura 15F muestra un producto intermedio de interruptor que comprende un TID (1535) y un ligador (1550), en el que el ligador comprende un grupo funcional (1545). La figura 15G muestra un producto intermedio de interruptor que comprende un TID (1535), un primer ligador (1540) y un segundo ligador (1560). La figura 15H muestra un producto intermedio de interruptor que comprende un TID (1535), un primer ligador (1550) y un segundo ligador (1560), en el que el primer ligador (1550) comprende un grupo funcional (1545).

Un producto intermedio de interruptor puede comprender un compuesto de fórmula IIIA: L1-Y o fórmula III: Y-L1, en la que Y comprende un TID que interacciona con una molécula de superficie que es al menos el 50% homóloga a PSMA y L1 comprende un ligador. El producto intermedio de interruptor puede comprender un compuesto de fórmula IIIA: L1-Y o fórmula III: Y-L1, en la que Y comprende ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico y L1 comprende un ligador. El TID puede interaccionar con una molécula de superficie que es al menos el 50%, 55%, 57%, 60%, 62%, 65%, 67%, 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97% o aproximadamente el 100% homóloga a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El TID puede interaccionar con una molécula de superficie que es al menos el 70% homóloga a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El TID puede interaccionar con una molécula de superficie que es al menos el 80% homóloga a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El TID puede interaccionar con una molécula de superficie que es al menos el 90% homóloga a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El TID puede interaccionar con una molécula de superficie que es al menos el 95% homóloga a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA).

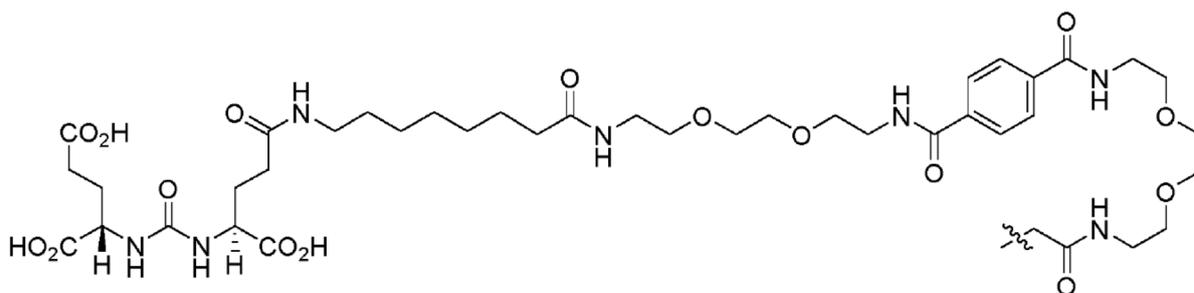
El producto intermedio de interruptor, mediante ejemplo no limitativo, puede comprender un compuesto seleccionado de los compuestos de fórmula VI, fórmula VII, fórmula VIII y fórmula IX:



(Fórmula VI),

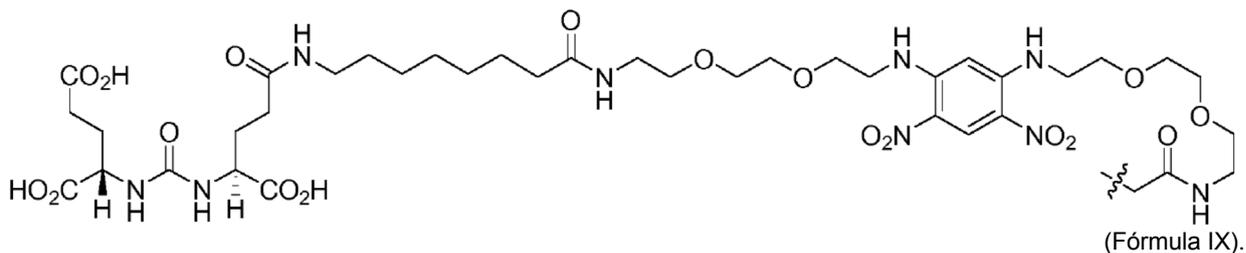


(Fórmula VII)



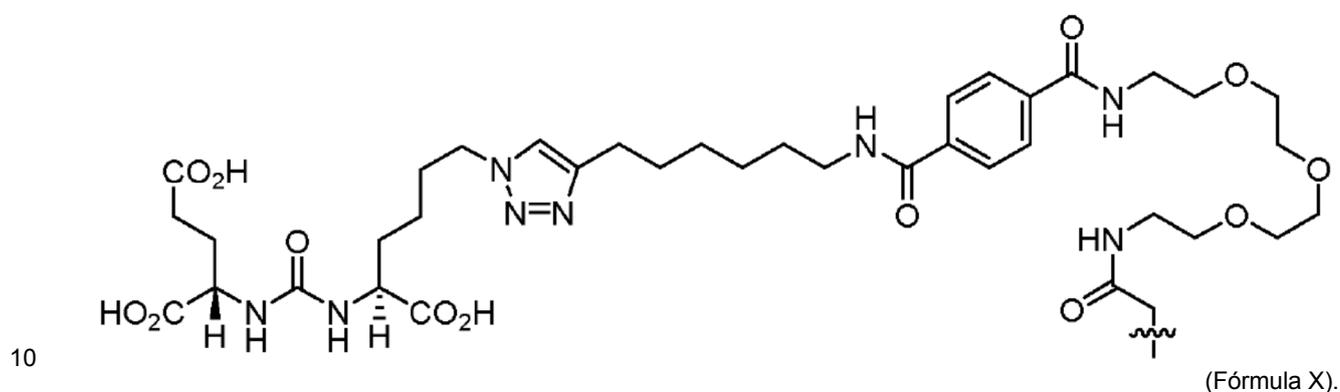
(Fórmula VIII)

y

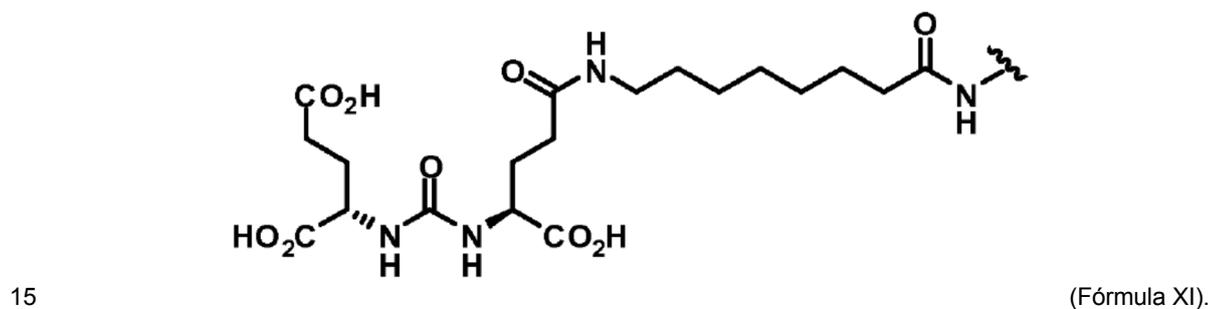


El producto intermedio de interruptor, mediante ejemplo no limitativo, puede comprender un compuesto seleccionado de un derivado, análogo, isómero, redistribución o modificación de los compuestos de fórmula VI, fórmula VII, fórmula VIII y fórmula IX.

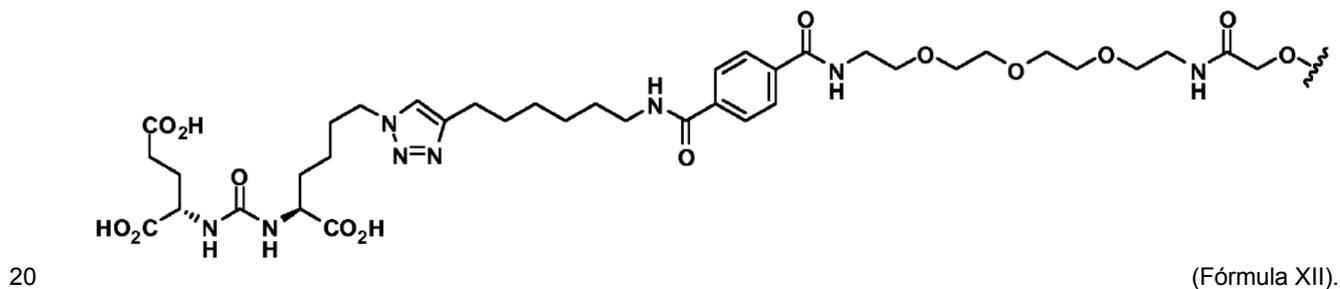
El producto intermedio de interruptor puede comprender un compuesto de fórmula X:



El producto intermedio de interruptor puede comprender un compuesto de fórmula XI:

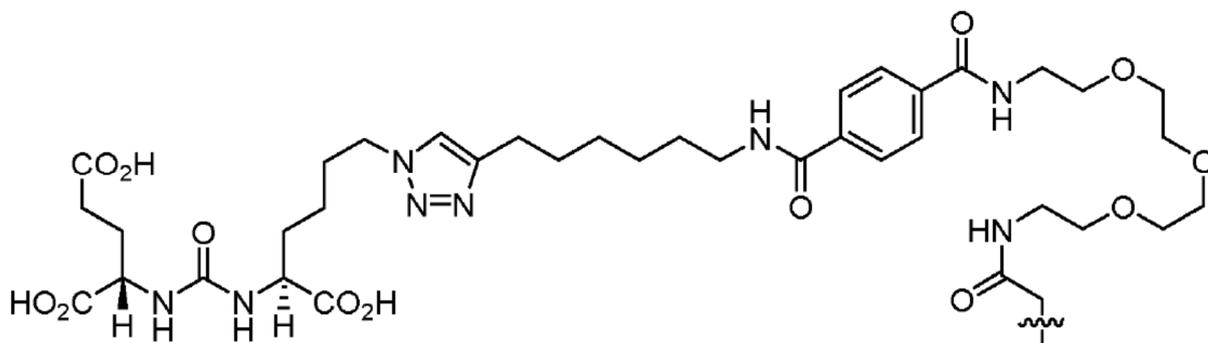


El producto intermedio de interruptor puede comprender un compuesto de fórmula XII:

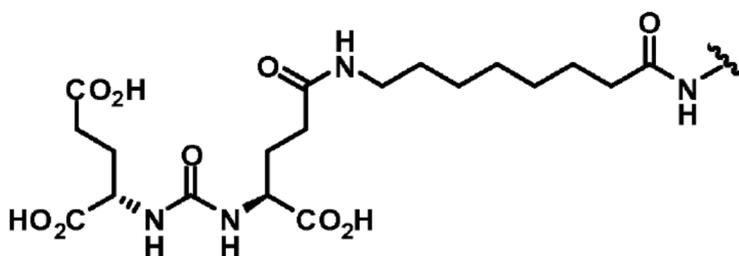


El producto intermedio de interruptor, mediante ejemplo no limitativo, puede comprender un compuesto seleccionado de un derivado, análogo, isómero, redistribución o modificación de los compuestos de fórmula X, fórmula XI y fórmula XII:

25

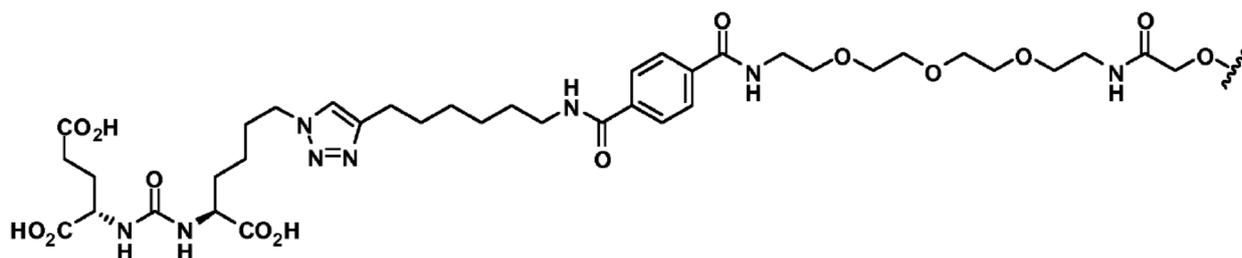


(Fórmula X).



(Formula XI),

5



(Fórmula XIII).

Se dan a conocer además en el presente documento interruptores de CAR-EC de fórmula XIII:

10

A-L-B (Fórmula XIII)

en la que:

15

A es un derivado de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado de ácido 2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metilamino)benzamido)pentanodioico (folato);

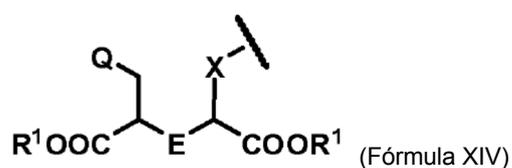
L es un enlace o un ligador; y

20

B es un derivado de fluoresceína o un derivado de biotina.

En algunas realizaciones, A de fórmula XIII (A-L-B) es un derivado de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico. El derivado de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico puede ser de fórmula XIV:

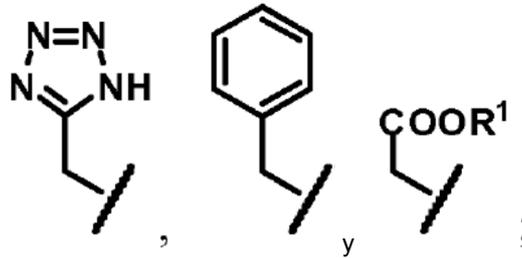
25



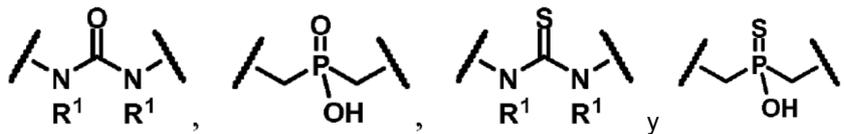
(Fórmula XIV)

en la que:

Q se selecciona del grupo que consiste en:



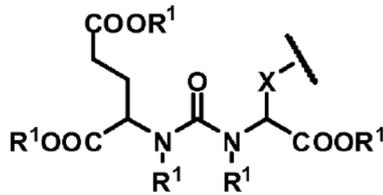
5 E se selecciona del grupo que consiste en:



10 X es alquileo C₁-C₅ o alquileo C₁-C₄(C=O)-; y

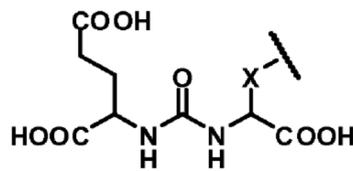
cada R¹ se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₄ o haloalquilo C₁-C₄.

El derivado de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico puede ser de fórmula XIVa:



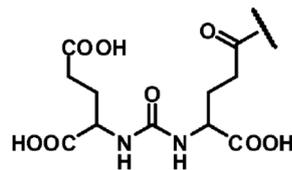
15 Fórmula (XIVa).

El derivado de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico puede ser un derivado de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico de fórmula IVb:



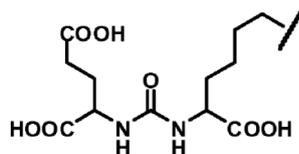
20 Fórmula (XIVb).

El derivado de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico puede ser de fórmula XIVc:



25 Fórmula (XIVc).

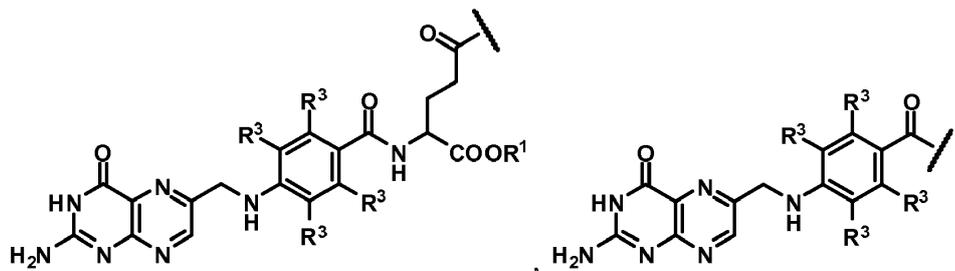
El derivado de ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico puede ser de fórmula XIVd:



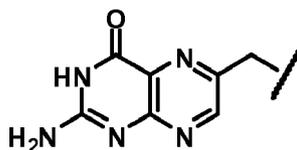
Fórmula (XIVd).

En algunas realizaciones, A de fórmula XIII (A-L-B) es un derivado de folato. El derivado de folato puede seleccionarse del grupo que consiste en:

5



y



10

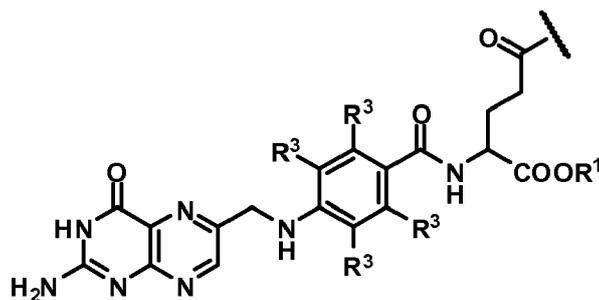
en los que:

R¹ es hidrógeno, alquilo C₁-C₄ o haloalquilo C₁-C₄; y

15

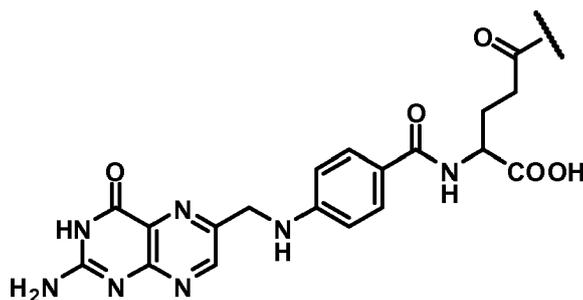
cada R³ se selecciona independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo C₁-C₄ y alcoxilo C₁-C₄.

El derivado de folato puede ser:



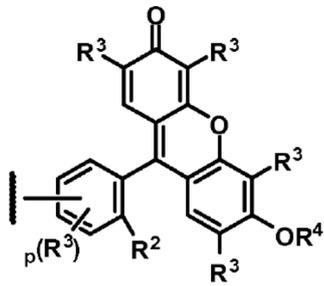
20

El derivado de folato puede ser:

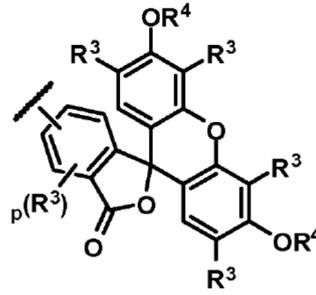


25

En algunas realizaciones, B de fórmula XIII (A-L-B) es un derivado de fluoresceína. El derivado de fluoresceína puede seleccionarse de la fórmula XV y fórmula XVI:



Fórmula (XV)



Fórmula (XVI)

en las que:

5

R^2 es $-C(=O)O(R^1)$ o $-C(=O)N(R^a)_2$;

cada R^a se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_4 ; o

10

dos R^a tomados juntos forman un anillo de heterocicilo opcionalmente sustituido;

cada R^3 se selecciona independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo C_1-C_4 y alcoxilo C_1-C_4 ;

p es 0-3;

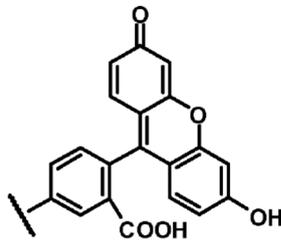
15

R^4 es hidrógeno, alquilo C_1-C_4 , $-C(=O)$ alquilo C_1-C_4 o $-CH_2-C(=O)OR^1$; y

R^1 es hidrógeno, alquilo C_1-C_4 o haloalquilo C_1-C_4 .

20

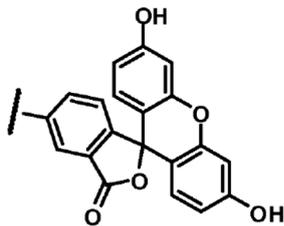
El derivado de fluoresceína de fórmula XV puede ser de fórmula XVa:



Fórmula (XVa).

El derivado de fluoresceína de fórmula XVI puede ser de fórmula XVIa:

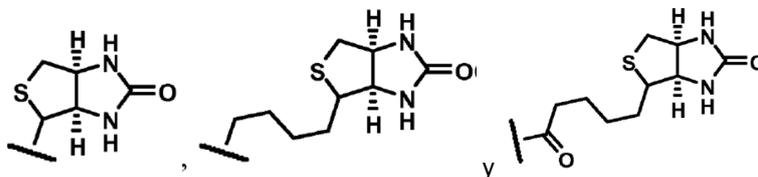
25



Fórmula (XVIa).

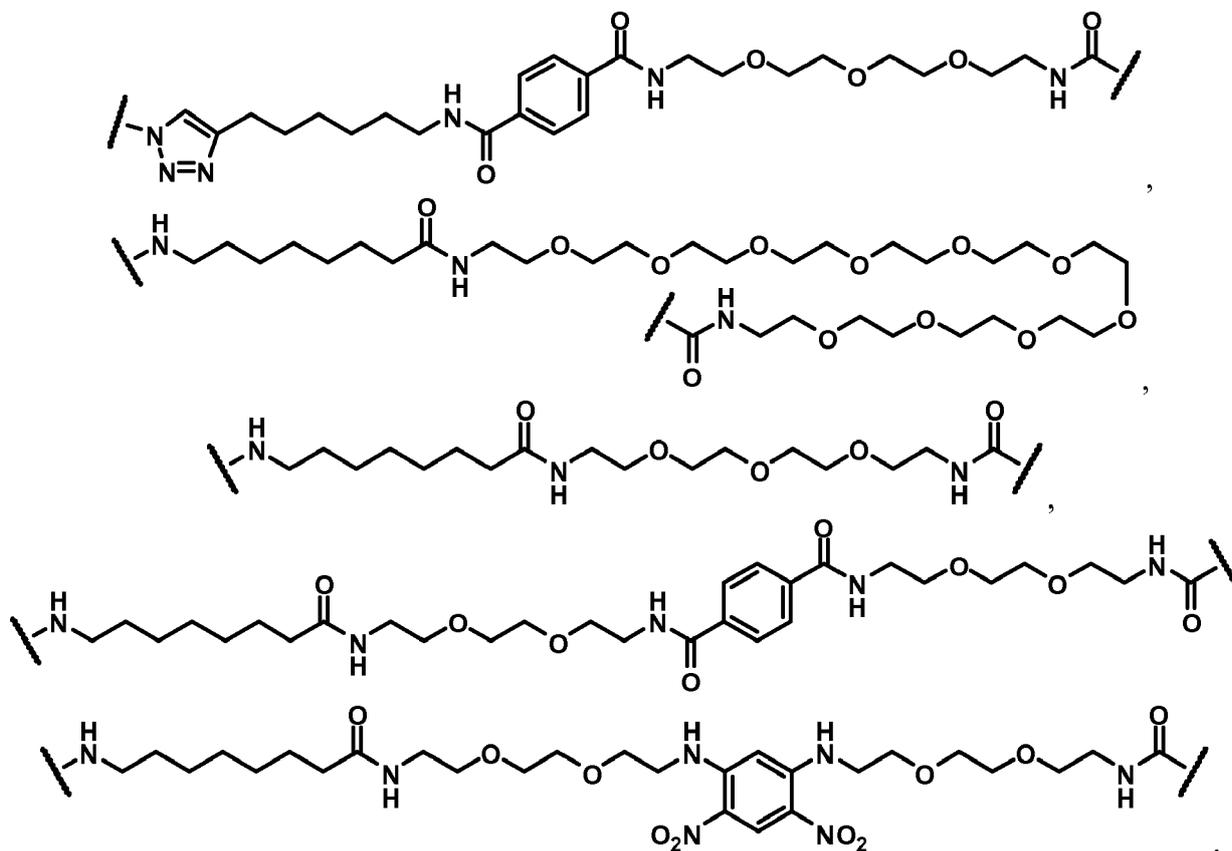
B de Fórmula XIII (A-L-B) puede ser un derivado de biotina. El derivado de biotina puede seleccionarse del grupo que consiste en:

30

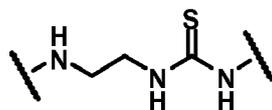


L de fórmula XIII (A-L-B) puede ser un ligador. El ligador puede comprender un triazol. El triazol puede ser un 1,2,3-triazol. El triazol puede ser un 1,2,4-triazol. El ligador puede comprender un arilo o un heteroarilo. El ligador puede comprender un arilo. El arilo puede ser fenilo. El fenilo puede estar disustituido. El fenilo disustituido puede ser fenilo 1,4-disustituido. El fenilo disustituido puede ser fenilo 1,3-disustituido. El fenilo puede estar trisustituido. El fenilo puede estar tetrasustituido. Dos de los sustituyentes del fenilo sustituido pueden ser NO₂. En algunos casos, el ligador no comprende un sustituyente de bencilo. El ligador puede comprender una o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender múltiples unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 2 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 3 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 4 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 5 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 6 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 7 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 8 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 9 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 10 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 11 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 12 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 13 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 14 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender una amida en un extremo. El ligador puede comprender una amida en un extremo y una amina en el otro extremo. El ligador puede comprender una amida en un extremo y un triazol en el otro extremo.

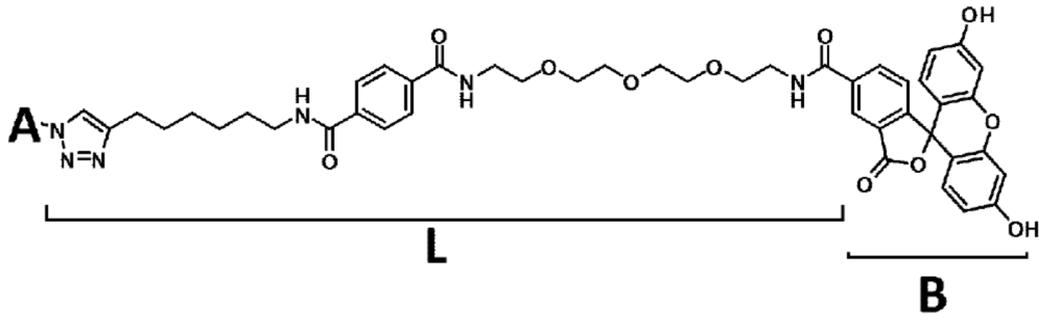
El ligador puede seleccionarse del grupo que consiste en:



y



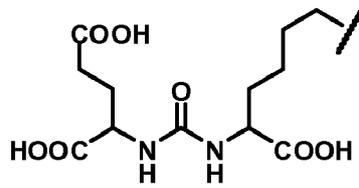
La fórmula XIII (A-L-B) puede ser de fórmula XIIIa:



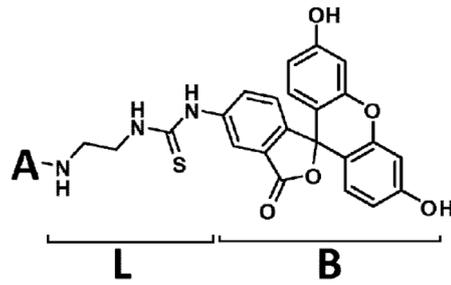
Fórmula (XIIIa).

A de fórmula XIIIa puede ser

5



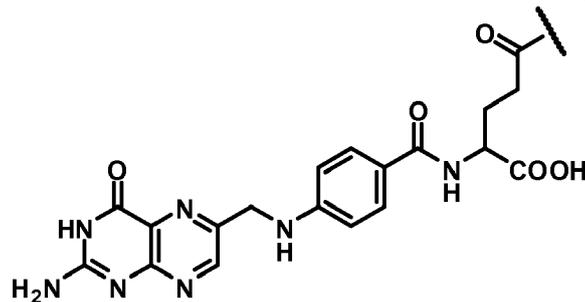
La fórmula XIII puede ser de fórmula XIIIb:



Fórmula (XIIIb).

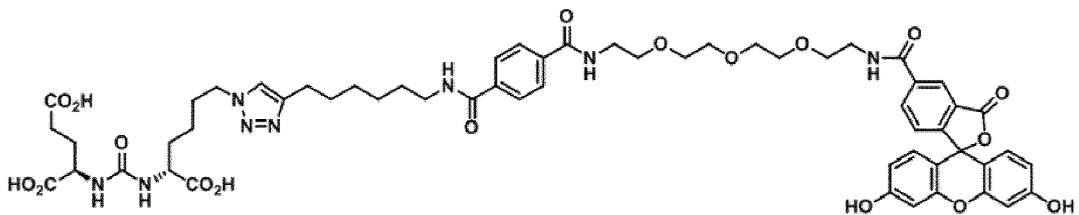
10

A puede ser

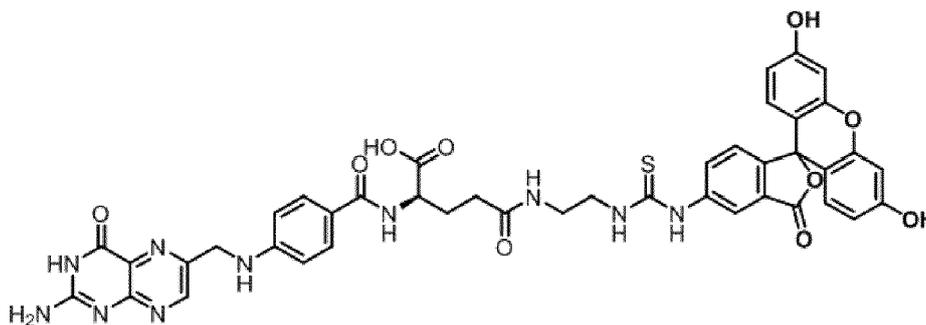


15

En algunas realizaciones de interruptores de CAR-EC de fórmula XIII, el interruptor de CAR-EC es:



En otras realizaciones de interruptores de CAR-EC de fórmula XIII, el interruptor de CAR-EC es:



Dominios de interacción con receptores de antígenos quiméricos (CAR-ID)

5 Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender uno o más dominios de interacción con receptores de antígenos quiméricos (CAR-ID). Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender dos o más dominios de interacción con receptores de antígenos quiméricos (CAR-ID). Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender tres o más dominios de interacción con receptores de antígenos quiméricos (CAR-ID). Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender cuatro o más dominios de interacción con receptores de antígenos quiméricos (CAR-ID). Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dominios de interacción con receptores de antígenos quiméricos (CAR-ID). Los dos o más CAR-ID pueden ser iguales. Al menos dos de los tres o más CAR-ID pueden ser diferentes. El número de CAR-ID puede optimizarse por seguridad o eficacia. Por ejemplo, uno o dos CAR-ID por TID pueden producir una activación de CAR-T eficaz mientras que tres o cuatro CAR-ID por TID pueden dar como resultado la activación inespecífica del CAR-T pueden dar como resultado la activación inespecífica del CAR-T.

20 Los productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender uno o más dominios de interacción con receptores de antígenos quiméricos (CAR-ID). Los productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender dos o más dominios de interacción con receptores de antígenos quiméricos (CAR-ID). Los productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender tres o más dominios de interacción con receptores de antígenos quiméricos (CAR-ID). Los productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender cuatro o más dominios de interacción con receptores de antígenos quiméricos (CAR-ID). Los productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dominios de interacción con receptores de antígenos quiméricos (CAR-ID). Los dos o más CAR-ID pueden ser iguales. Al menos dos de los tres o más CAR-ID pueden ser diferentes. Los dos o más CAR-ID pueden ser diferentes. Al menos dos de los tres o más CAR-ID pueden ser diferentes.

30 El CAR-ID puede ser una molécula que se produce de manera natural. Por ejemplo, el CAR-ID puede basarse o derivarse de una proteína endógena. Alternativamente, el CAR-ID puede comprender una versión de tipo natural de una proteína. El CAR-ID puede ser una molécula artificial o sintética. Por ejemplo, el CAR-ID puede comprender una proteína que comprende uno o más aminoácidos no naturales. Alternativamente, el CAR-ID puede comprender una versión modificada de una proteína de tipo natural que no se produce de manera natural. El CAR-ID puede ser capaz de cruzar una membrana celular cuando no está unido a un dominio de interacción con la diana (TID) del interruptor de CAR-EC. En algunos casos, al menos una porción de un CAR-ID no está codificada genéticamente. Al menos una porción de un CAR-ID puede ser sintética. El CAR-ID puede comprender un polipéptido que no se produce de manera natural. El CAR-ID puede ser una molécula orgánica. El CAR-BC puede ser una molécula inorgánica.

40 El CAR-ID puede ser una molécula pequeña. La molécula pequeña puede ser un compuesto orgánico. La molécula pequeña puede tener un tamaño del orden de aproximadamente 10^{-8} m, aproximadamente 10^{-9} m, aproximadamente 10^{-10} m. La molécula pequeña puede tener un tamaño de menos de aproximadamente 10^{-7} m. La molécula pequeña puede tener un tamaño de menos de aproximadamente 10^{-8} m. La molécula pequeña puede tener un tamaño de menos de aproximadamente 10^{-9} m. La molécula pequeña puede tener un tamaño de menos de aproximadamente 10^{-10} m. La molécula pequeña puede tener un tamaño de menos de aproximadamente 10^{-11} m.

50 La molécula pequeña puede tener una masa de menos de aproximadamente 5000 kDa, menos de aproximadamente 4500 kDa, menos de aproximadamente 4000 kDa, menos de aproximadamente 3500 kDa, menos de aproximadamente 3000 kDa, menos de aproximadamente 2500 kDa, menos de aproximadamente 2000 kDa, menos de aproximadamente 1500 kDa, menos de aproximadamente 1000 kDa, menos de aproximadamente 900 kD, menos de aproximadamente 500 kDa o menos de aproximadamente 100 kDa.

En algunos casos, la molécula pequeña no comprende un polipéptido. En algunos casos, la molécula pequeña comprende dos o más aminoácidos que están unidos por un enlace amida. La molécula pequeña puede ser un compuesto químico.

5 El CAR-ID puede comprender un hapteno. El CAR-ID puede inducir una respuesta inmunitaria cuando está unido a una molécula portadora más grande, tal como una proteína, anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El CAR-ID puede ser FITC o un derivado del mismo. El CAR-ID puede seleccionarse de DOTA, dinitrofenol, quinona, biotina, anilina, atrazina, un derivado de anilina, ácido o-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido m-aminobenzoico, hidralazina, halotano, digoxigenina, arsonato de benceno, lactosa, trinitrofenol, biotina o un derivado de los mismos. El CAR-ID
10 puede ser un fármaco de penicilina o un derivado del mismo. El CAR-ID puede ser una quinona o un derivado de la misma. El CAR-ID puede ser DOTA o un derivado del mismo. El CAR-ID puede ser dinitrofenol o un derivado del mismo. El CAR-ID puede ser biotina o un derivado de la misma.

15 Alternativamente, el CAR-ID no comprende un hapteno. El CAR-ID puede seleccionarse de un esteroide, una vitamina, un vitámero, un metabolito, un antibiótico, un monosacárido, un disacárido, un lípido, un ácido graso, un ácido nucleico, un alcaloide, un glicósido, una fenozina, un policétido, un terpeno y un tetrapirrol y una porción de los mismos.

Dominios de interacción con la diana (TID)

20 Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender uno o más dominios de interacción con la diana (TID). Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender dos o más dominios de interacción con la diana (TID). Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender tres o más dominios de interacción con la diana (TID). Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender cuatro o más dominios de interacción con la diana (TID). Los interruptores dados a
25 conocer en el presente documento pueden comprender 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dominios de interacción con la diana (TID). Los dos o más TID pueden ser iguales. Al menos dos de los tres o más TID pueden ser iguales. Los dos o más TID pueden ser diferentes. Al menos dos de los tres o más TID pueden ser diferentes.

30 Los productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender uno o más dominios de interacción con la diana (TID). Los productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender dos o más dominios de interacción con la diana (TID). Los productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender tres o más dominios de interacción con la diana (TID). Los productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender cuatro o más dominios de interacción con la diana (TID). Los productos intermedios de interruptores dados
35 a conocer en el presente documento pueden comprender 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dominios de interacción con la diana (TID). Los dos o más TID pueden ser iguales. Al menos dos de los tres o más TID pueden ser iguales. Los dos o más TID pueden ser diferentes. Al menos dos de los tres o más TID pueden ser diferentes.

40 Generalmente, el TID interacciona con una molécula sobre o desde una diana. El TID, mediante ejemplo no limitativo, puede seleccionarse de una molécula pequeña, un ligando, un agonista de receptor, un antagonista de receptor, un inhibidor enzimático, un aptámero de ADN, un aptámero de PNA, una vitamina, un sustrato y un análogo de sustrato. En algunos casos, el TID no comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

45 El TID puede comprender una vitamina o un derivado de la misma. La vitamina, mediante ejemplo no limitativo, puede seleccionarse de vitamina A, vitamina B, vitamina C, vitamina D, vitamina E y vitamina K. La vitamina puede ser vitamina C. La vitamina puede ser vitamina D. La vitamina puede comprender folato o un derivado del mismo. La vitamina puede ser folato o un derivado del mismo. El TID puede ser folato. El TID puede comprender un vitámero. El TID puede comprender un metabolito de vitamina o precursor de vitamina. La vitamina, mediante ejemplo no limitativo,
50 puede seleccionarse de retinol, retinal, beta-caroteno, un carotenoide, tiamina, riboflavina, niacina, niacinamida, ácido pantoténico, piridoxina, piridoxamina, piridozl, biotina, ácido fólico, ácido folínico, cianocobalamina, hidroxicobalamina, metilcobalamina, ácido ascórbico, colesterciferol, ergocalciferol, un tocoferol, un tocotrienol, una filoquinona y una menaquinona o un derivado de la misma. El TID puede comprender un antioxidante o un derivado del mismo.

55 El TID puede ser un inhibidor enzimático. El TID puede seleccionarse, mediante ejemplo no limitativo, de un inhibidor de tirosina cinasa, un inhibidor de proteasa, un inhibidor de receptor de factor de crecimiento, un inhibidor de receptor de hormonas, un inhibidor de cinasa janus, un inhibidor de cinasa de linfoma anaplásico (ALK), un inhibidor de Bcl-2, un inhibidor de poli ADP ribosa polimerasa (PARP), un inhibidor de PI3K, un inhibidor de Braf, un inhibidor de MAP cinasa, un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina y un inhibidor de proteína de choque térmico. El inhibidor enzimático puede seleccionarse de apatinib, bortezumib, imatinib, ibrutinib, seliciclib, bosutinib, cabozantinib, crizotinib, dabrafenib, dasatinib, doxorubicin, erlotinib, everolimus, gefitinib, imatinib, iniparib, lapatinib, LEE011, LGX818, milotinib, obatoclox, olaparib, pazopanib, PD-0332991, perifosina, ponatinib, regorafenib, ruxolitinib, salinomycin, sorafenib, sunitinib, tamoxifen, temsirolimus, tofacitinib, trametinib, vandetanib y vemurafenib o un derivado de los mismos.

65 El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureidol]pentanodioico o un derivado del mismo. El TID puede ser suficientemente pequeño como para penetrar en un tumor.

El TID puede comprender un polipéptido. El TID puede basarse en o derivarse de un polipéptido. El TID puede comprender un polipéptido sintético. Un polipéptido sintético puede referirse a un polipéptido que no está codificado genéticamente. El TID puede comprender un polipéptido que se produce de manera natural. Un polipéptido que se produce de manera natural puede referirse a un polipéptido que está codificado genéticamente. El polipéptido puede comprender aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85 o aproximadamente 90 o más aminoácidos.

El TID puede seleccionarse de una hormona liberadora de hormona luteinizante de hormona peptídica de 10 meros, bombesina, hormona liberadora de gonadotropina, pentagastrina, cRGD, octreotida, octreotato y análogos de los mismos. El TID puede unirse a una diana al menos el 50% homóloga a receptor de hormona liberadora de gonadotropina, un antígeno de membrana específico de la próstata, una molécula similar a lectina de tipo c, un receptor de folato, un receptor de colecistocinina B, un receptor de somatostatina, una integrina $\alpha\beta3$, un receptor de péptido liberador de gastrina, un receptor de neurocinina, un receptor de melanocortina, un receptor de neurotenina, un receptor de hormona liberadora de hormona luteinizante y un receptor de neuropéptido.

El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que se basa en o se deriva de una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos el 60% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos el 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56.

El TID puede comprender un agonista de receptor de colecistocinina B. El TID puede comprender un agonista de receptor de colecistocinina B (por ejemplo, agonista de CCK2). Mediante ejemplo no limitativo, el TID puede comprender un antagonista de receptor de colecistocinina B tal como se representa en la figura 7.

El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Tal como se usa en el presente documento, el término "fragmento de anticuerpo" se refiere a cualquier forma de un anticuerpo distinta de la forma de longitud completa. Los fragmentos de anticuerpo en el presente documento incluyen anticuerpos que son componentes más pequeños que existen dentro de anticuerpos de longitud completa, y anticuerpos que se han diseñado por ingeniería genética. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fc, Fab y (Fab')₂, Fv de cadena sencilla (scFv), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de CDR, regiones variables, regiones de entramado, regiones constantes, cadenas pesadas, cadenas ligeras, moléculas distintas de anticuerpos de armazón alternativo y anticuerpos biespecíficos. A menos que se indique específicamente otra cosa, las frases y reivindicaciones que usan el término "anticuerpo" o "anticuerpos" pueden incluir específicamente "fragmento de anticuerpo" y "fragmentos de anticuerpos."

El TID puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que puede seleccionarse de Fv, Fc, Fab y (Fab')₂, Fv de cadena sencilla (scFv), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, TCR de disolución monoclonales, región determinante de complementariedad 1 (CDR1), CDR2, CDR3, combinaciones de CDR, regiones variables, regiones de entramado, regiones constantes, cadenas pesadas, cadenas ligeras, moléculas distintas de anticuerpos de armazón alternativo y anticuerpos biespecíficos. El polipéptido puede ser una inmunoglobulina. El polipéptido puede ser un Fab. El TID puede ser un TCR monoclonal.

El TID puede ser un anticuerpo humano, completamente humano, humanizado, diseñado por ingeniería genética humano, no humano y/o quimérico. El anticuerpo no humano puede humanizarse para reducir la inmunogenicidad para seres humanos, al tiempo que retiene la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las CDR (o porciones de las mismas) se derivan de un anticuerpo no humano, y las FR (o porciones de las mismas) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprende opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de CDR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la afinidad o especificidad del anticuerpo.

El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo quimérico. Anticuerpos quiméricos pueden referirse a

anticuerpos creados a través de la unión de dos o más genes de anticuerpos que originalmente codificaban para anticuerpos separados. Un anticuerpo quimérico puede comprender al menos un aminoácido de un primer anticuerpo y al menos un aminoácido de un segundo anticuerpo, en el que los anticuerpos primero y segundo son diferentes. Al menos una porción del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser de una especie bovina, una especie humana o una especie murina. Al menos una porción del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser de una rata, una cabra, una cobaya o un conejo. Al menos una porción del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser de un ser humano. Al menos una porción del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser de un mono cynomolgus.

El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de un mamífero, ave, pez, anfibio y reptil. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, carnívoros, roedores, elefantes, marsupiales, conejos, murciélagos, primates, focas, osos hormigueros, cetáceos, ungulados de dedos impares y ungulados de dedos pares. El mamífero puede ser un humano, primate no humano, ratón, oveja, gato, perro, vaca, caballo, cabra o cerdo.

El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-Her2, anticuerpo anti-EGFR, anti-CD22 anticuerpo, anticuerpo anti-CS1, anticuerpo anti-CLL-1, anticuerpo anti-CD33 y anticuerpo anti-CEA. El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento del mismo. El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-Her2 o fragmento del mismo. El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-EGFR o fragmento del mismo. El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-EGFRvIII o fragmento del mismo. El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-BCMA o fragmento del mismo. El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-CS1 o fragmento del mismo. El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-CLL-1 o fragmento del mismo. El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-CD33 o fragmento del mismo. El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-CEA o fragmento del mismo.

El TID puede basarse en o derivarse de una inmunoglobulina (Ig). La inmunoglobulina puede seleccionarse de una IgG, una IgA, una IgD, una IgE, un IgM, un fragmento de la misma o una versión modificada de la misma. La inmunoglobulina puede ser IgG. La IgG puede ser IgG1. La IgG puede ser IgG2. La IgG puede tener una o más mutaciones de Fc para unión a receptor de Fc (FcR) reducida. Las mutaciones de Fc pueden estar en la cadena pesada de la IgG. Las mutaciones de Fc en la IgG1 pueden ser L234A y L235A. Las mutaciones de Fc en la IgG1 pueden ser L234A y L235E. La mutación de Fc en la IgG1 puede ser N297A. La mutación de Fc en la IgG2 puede ser V234A y V237A. El TID puede comprender una inmunoglobulina nula para Fc o un fragmento de la misma.

El TID puede comprender un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en adotrastuzumab emtansina, alemtuzumab, bevacizumab, brentuximab vedotina, gemtuzumab ozogamicina, ipilimumab ibritumomab tiuxetano o panitumab o un fragmento de los mismos. En algunos casos, el TID no comprende cetuximab. El TID puede ser erbitux o un fragmento del mismo. El TID puede no ser erbitux. El TID puede ser rituximab o un fragmento del mismo. El TID puede no ser rituximab. El TID puede ser trastuzumab o un fragmento del mismo. El TID puede no ser trastuzumab.

El TID puede ser un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento del mismo. El TID puede ser un anticuerpo anti-CD22 o un fragmento del mismo. El TID puede no ser un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento del mismo. El TID puede seleccionarse como diana un antígeno seleccionado de, mediante ejemplo no limitativo, Her2, CLL-1, CD33, EGFRvIII, CD20, BCMA, CS1 o un fragmento de los mismos. El antígeno puede comprender un antígeno de tipo natural. El antígeno puede comprender una o más mutaciones.

El TID puede comprender un anticuerpo anti-CD19 o fragmento del mismo. La cadena ligera del anticuerpo anti-CD19 o fragmento del mismo puede comprender SEQ ID NO: 16 o una secuencia de aminoácidos homóloga. La secuencia de aminoácidos puede ser aproximadamente el 99%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5% o aproximadamente el 2% homóloga a SEQ ID NO: 16. La cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 o fragmento del mismo puede comprender SEQ ID NO: 17 o una secuencia de aminoácidos homóloga. La secuencia de aminoácidos puede ser aproximadamente el 99%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5% o aproximadamente el 2% homóloga a SEQ ID NO: 17.

El TID puede ser un anticuerpo anti-BCMA o un fragmento del mismo. El TID puede ser un anticuerpo anti-CS1 o un fragmento del mismo. El TID puede ser un anticuerpo anti-EGFRvIII o un fragmento del mismo. El TID puede ser un

anticuerpo anti-Her2 o un fragmento del mismo. El TID puede comprender un anticuerpo anti-CD20 o fragmento de anticuerpo. El TID puede comprender un anticuerpo anti-CEA o fragmento de anticuerpo. El TID puede comprender un anticuerpo anti-EGFR o fragmento de anticuerpo. El TID puede comprender un anticuerpo anti-CEA o fragmento de anticuerpo. El TID puede comprender un anticuerpo anti-CD33 o fragmento de anticuerpo. El TID puede comprender un anticuerpo anti-CD33 o fragmento de anticuerpo. El TID puede comprender trastuzumab o fragmento del mismo. El TID puede no comprender cetuximab o fragmento del mismo. El TID puede no comprender trastuzumab o fragmento del mismo. El TID puede no comprender rituximab o fragmento del mismo. El TID puede no comprender un anticuerpo frente a EpCAM o fragmento del mismo. El TID puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo codificado por una secuencia de nucleótidos o aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 5-9, en la que el aminoácido no natural puede reemplazar a cualquier aminoácido del anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

El TID puede ser una molécula pequeña. La molécula pequeña puede ser ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico. La molécula pequeña puede ser folato. El CAR-ID puede ser FITC o un derivado del mismo. El interruptor de CAR-EC puede comprender además un segundo TID. El interruptor de CAR-EC puede comprender más de 1, 2, 3, 4 o 5 TID.

El TID puede basarse en o derivarse de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en proteína A, una lipocalina, un dominio de fibronectina, un dominio de repetición consenso de anquirina y una tiorredoxina.

Los interruptores de CAR-EC dados a conocer en el presente documento pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales. El uno o más CAR-ID pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales. El uno o más TID pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales. El uno o más ligadores pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales. La unión del CAR-ID al TID puede producirse por medio del uno o más aminoácidos no naturales. El uno o más ligadores pueden unir el uno o más CAR-ID al uno o más TID de manera específica de sitio a través del uno o más aminoácidos no naturales. Alternativa o adicionalmente, el uno o más ligadores pueden unir el uno o más TID al uno o más TID de manera específica de sitio, en el que no se requiere un aminoácido no natural para unir el uno o más TID al uno o más TID. El TID puede unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o más aminoácidos no naturales en el TID. El TID puede unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o más aminoácidos no naturales en el TID de manera específica de sitio. Alternativamente, el TID puede unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o más aminoácidos no naturales en el TID. El TID puede unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o más aminoácidos no naturales en el TID de manera específica de sitio.

El dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. Los CAR-ID dados a conocer en el presente documento pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos no naturales. El TID puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. Los anticuerpos de direccionamiento o fragmentos de anticuerpos dados a conocer en el presente documento pueden comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos no naturales. El aminoácido no natural puede reaccionar con el ligador para crear un enlace químico.

El uno o más aminoácidos no naturales puede insertarse entre dos aminoácidos que se producen de manera natural en el TID. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a uno o más aminoácidos que se producen de manera natural en el TID. El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse en el extremo N-terminal del TID. El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse en el extremo C-terminal del TID. El aminoácido no natural puede incorporarse distal a la región del TID que interacciona con una molécula sobre o desde una diana. El aminoácido no natural puede incorporarse cerca de la región del TID que interacciona con una molécula sobre o desde una diana. El aminoácido no natural puede incorporarse en la región del TID que interacciona con una molécula sobre o desde una diana.

El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a uno o más aminoácidos en el TID. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a cualquier aminoácido no natural en el TID.

El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse en una cadena ligera de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse en una cadena pesada de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse en una cadena pesada y una cadena ligera de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a un aminoácido en la cadena ligera de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a un aminoácido en una cadena pesada de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a un aminoácido en una cadena pesada y una cadena ligera de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva.

El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a una alanina de una cadena ligera de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a una cisteína de una cadena ligera de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a una serina de una cadena ligera de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a una lisina de una cadena ligera de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden

reemplazar a una asparagina de una cadena ligera de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a una treonina de una cadena ligera de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a una alanina de una cadena pesada de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a una cisteína de una cadena pesada de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a una serina de una cadena pesada de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a una lisina de una cadena pesada de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a una asparagina de una cadena pesada de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a una treonina de una cadena pesada de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva.

El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a Ser 202 de la cadena ligera de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a Lys 136 de la cadena pesada de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a Ala 123 de la cadena pesada de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a Ser 202 de la cadena ligera y la Lys 136 de la cadena pesada de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a Thr 109 de la cadena ligera de la inmunoglobulina a partir de la cual el TID se basa o se deriva. El aminoácido no natural puede reemplazar a un aminoácido de la cadena ligera del anticuerpo a partir del cual el polipéptido se basa o se deriva. Por ejemplo, el aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de serina de la cadena ligera del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a serina 202 de la cadena ligera del anticuerpo o un homólogo de la misma. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de glicina de la cadena ligera del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a glicina 68 de la cadena ligera del anticuerpo o un homólogo de la misma. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de treonina de la cadena ligera del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a treonina 109 de la cadena ligera del anticuerpo o un homólogo de la misma. El polipéptido puede basarse en o derivarse de una cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de lisina de la cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a lisina 136 de la cadena pesada del anticuerpo o un homólogo de la misma. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de alanina de la cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a alanina 123 de la cadena pesada del anticuerpo o un homólogo de la misma. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de serina de la cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a serina 74 de la cadena pesada del anticuerpo o un homólogo de la misma. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de aminoácido de la cadena ligera del anticuerpo y un residuo de aminoácido de la cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de glicina de la cadena ligera del anticuerpo y un aminoácido de la cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de glicina de la cadena ligera del anticuerpo y un residuo de serina de la cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de serina de la cadena pesada del anticuerpo y un residuo de aminoácido de la cadena ligera del anticuerpo. El residuo de glicina de la cadena ligera del anticuerpo puede ser glicina 68 o un homólogo de la misma. El residuo de serina de la cadena pesada del anticuerpo puede ser serina 74 o un homólogo de la misma. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de serina de la cadena ligera del anticuerpo y un aminoácido de la cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de serina de la cadena ligera del anticuerpo y un residuo de lisina de la cadena pesada del anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a un residuo de lisina de la cadena pesada del anticuerpo y un residuo de aminoácido de la cadena ligera del anticuerpo. El residuo de serina de la cadena ligera del anticuerpo puede ser serina 202 o un homólogo de la misma. El residuo de serina de la cadena pesada del anticuerpo puede ser lisina 136 o un homólogo de la misma.

El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a un aminoácido del TID, en el que el TID es un anticuerpo anti-CD 19 o fragmento del mismo. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a cualquier serina de una cadena ligera del anticuerpo anti-CD 19 o fragmento del mismo. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a cualquier lisina de una cadena ligera del anticuerpo anti-CD 19 o fragmento del mismo. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a cualquier asparagina de una cadena ligera del anticuerpo anti-CD 19 o fragmento del mismo. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a cualquier treonina de una cadena ligera del anticuerpo anti-CD 19 o fragmento del mismo. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a cualquier serina de una cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 o fragmento del mismo. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a cualquier lisina de una cadena pesada del anticuerpo anti-CD 19 o fragmento del mismo. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a cualquier asparagina de una cadena pesada del anticuerpo anti-CD 19 o fragmento del mismo. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a cualquier treonina de una cadena pesada del anticuerpo anti-CD 19 o fragmento del mismo. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD 19 o fragmento del mismo, en el que el uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a uno o más aminoácidos de una cadena ligera del anticuerpo anti-CD 19 o fragmento del mismo. La cadena ligera del anticuerpo anti-CD 19 o fragmento del mismo puede comprender SEQ ID NO: 16. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a uno o más aminoácidos de SEQ ID NO: 16. El uno o más aminoácidos de SEQ ID NO: 16 pueden seleccionarse del grupo que comprende G68, K107, T109, E152, S156, K169 y S202. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a uno o más aminoácidos de una cadena pesada

del anticuerpo anti-CD 19 o fragmento del mismo. La cadena pesada del anticuerpo anti-CD 19 o fragmento del mismo puede comprender SEQ ID NO: 17. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a uno o más aminoácidos de SEQ ID NO: 17. El uno o más aminoácidos de SEQ ID NO: 17 pueden seleccionarse del grupo que consiste en S74, A121 y K136.

5 El uno o más aminoácidos no naturales pueden estar codificados por un codón que no codifica para uno de los veinte aminoácidos naturales. El uno o más aminoácidos no naturales puede estar codificado por un codón sin sentido (codón de terminación). El codón de terminación puede ser un codón ámbar. El codón ámbar puede comprender una secuencia UAG. El codón de terminación puede ser un codón ocre. El codón ocre puede comprender una secuencia de UAA. El codón de terminación puede ser un codón ópalo o ámbar. El codón ópalo o ámbar puede comprender una secuencia UGA. El uno o más aminoácidos no naturales puede estar codificado por un codón de cuatro bases.

10 El uno o más aminoácidos no naturales pueden ser p-acetilfenilalanina (pAcF o pAcPhe). El uno o más aminoácidos no naturales pueden ser selenocisteína. El uno o más aminoácidos no naturales pueden ser p-fluorofenilalanina (pFPhe). El uno o más aminoácidos no naturales pueden seleccionarse del grupo que comprende p-azidofenilalanina (pAzF), p-azidometilfenilalanina (pAzCH₂F), p-benzoilfenilalanina (pBpF), p-propargiloxifenilalanina (pPrF), p-yodofenilalanina (pIF), p-cianofenilalanina (pCNF), p-carboximetilfenilalanina (pCmF), 3-(2-naftil)alanina (NapA), p-boronofenilalanina (pBoF), o-nitrofenilalanina (oNiF), (8-hidroxiquinolin-3-il)alanina (HQA), selenocisteína y (2,2'-bipiridin-5-il)alanina (BipyA). El uno o más aminoácidos no naturales pueden ser 4-(6-metil-s-tetrazin-3-il)aminofenilalanina.

15 El uno o más aminoácidos no naturales pueden ser β-aminoácidos (β3 y β2), homo-aminoácidos, prolina y derivados de ácido pirúvico, derivados de alanina 3-sustituidos, derivados de glicina, derivados de fenilalanina y tirosina de anillo sustituido, aminoácidos de núcleo lineal, diaminoácidos, D-aminoácidos, N-metilaminoácidos, o una combinación de los mismos.

20 Los ejemplos adicionales de aminoácidos no naturales incluyen, pero no se limitan a, 1) diversos análogos de tirosina y fenilalanina sustituidos tales como O-metil-L-tirosina, p-amino-L-fenilalanina, 3-nitro-L-tirosina, p-nitro-L-fenilalanina, m-metoxi-L-fenilalanina y p-isopropil-L-fenilalanina; 2) aminoácidos con grupos arilazida y benzofenona que pueden estar fotoreticulados; 3) aminoácidos que tienen reactividad química única incluyendo acetil-L-fenilalanina y m-acetil-L-fenilalanina, O-alil-L-tirosina, O-(2-propinil)-L-tirosina, p-etiltiocarbonil-L-fenilalanina y p-(3-oxobutanoil)-L-fenilalanina; 4) aminoácidos que contienen átomos pesados para ajuste de fase en cristalografía de rayos X incluyendo p-yodo y p-bromo-L-fenilalanina; 5) el aminoácido activo redox dihidroxi-L-fenilalanina; 6) aminoácidos glicosidados que incluyen b-N-acetilglucosamina-O-serina y a-N-acetilgalactosamina-O-treonina; 7) aminoácidos fluorescentes con cadenas laterales de naftilo, dansilo y 7-aminocumarina; 8) aminoácidos fotoescindibles y fotoisomerizables con cadenas laterales de Cys, Ser y Tyr de azobenceno y nitrobenzilo; 9) la p-carboximetil-L-fenilalanina mimética de fosfotirosina; 10) el homólogo de glutamina homoglutamina; y 11) ácido 2-aminooctanoico. El aminoácido no natural puede modificarse para incorporar un grupo químico. El aminoácido no natural puede modificarse para incorporar un grupo cetona.

25 El uno o más aminoácidos no naturales pueden comprender al menos un grupo oxima, carbonilo, dicarbonilo, hidroxilamina o una combinación de los mismos. El uno o más aminoácidos no naturales pueden comprender al menos un grupo funcional carbonilo, dicarbonilo, alcoxi-amina, hidrazina, alqueno acíclico, alquino acíclico, ciclooctino, aril/alquilazida, norborneno, ciclopropeno, transcicloocteno o tetrazina o una combinación de los mismos.

30 El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse en el TID y/o el CAR-ID mediante métodos conocidos en la técnica. Pueden usarse sistemas basados en células o libres de células para alterar la secuencia genética del TID y/o el CAR-ID, produciendo de ese modo el TID y/o el CAR-ID con uno o más aminoácidos no naturales. Pueden usarse cepas auxótrofas en lugar de ARNt y sintetasa modificados por ingeniería genética. El uno o más aminoácidos no naturales pueden producirse a través de reacción selectiva de uno o más aminoácidos naturales. La reacción selectiva puede estar mediada por una o más enzimas. En un ejemplo no limitativo, la reacción selectiva de una o más cisteínas con una enzima que genera formilglicina (FGE) puede producir una o más formilglicinas (véase Rabuka *et al.*, Nature Protocols 7:1052-1067 (2012)).

35 El uno o más aminoácidos no naturales pueden tomar parte en una reacción química para formar un ligador. La reacción química para formar el ligador puede ser una reacción biortogonal. La reacción química para formar el ligador puede ser química "click".

40 Se dan a conocer aminoácidos no naturales adicionales en Liu *et al.* (Annu Rev Biochem, 79:413-44, 2010), Wang *et al.* (Angew Chem Int Ed, 44:34-66, 2005) y las solicitudes PCT números PCT/US2012/039472, PCT/US2012/039468, PCT/US2007/088009, PCT/US2009/058668, PCT/US2007/089142, PCT/US2007/088011, PCT/US2007/001485, PCT/US2006/049397, PCT/US2006/047822 y PCT/US2006/044682.

45 Un experto en la técnica preverá que la plataforma de CAR-EC puede expandirse a una variedad de moléculas en una célula que va a seleccionarse como diana en una enfermedad o estado. A modo de ejemplo no limitativo, los interruptores de CAR-EC dados a conocer en el presente documento pueden comprender TID basados en o derivados

de anticuerpos que seleccionan como diana EGFR de cáncer de colon y pulmón, EGFRvIII para glioma y glioblastoma, BCMA y CS1 para mieloma múltiple, y CLL-1 y CD33 para leucemia mieloide aguda. Los interruptores de CAR-EC dados a conocer en el presente documento pueden comprender TID que comprenden moléculas pequeñas usadas para seleccionar como diana células cancerosas. Pueden usarse interruptores de CAR-EC que comprenden un TID que comprende folato para tratar cáncer de ovario. Pueden usarse interruptores de CAR-EC que comprenden un TID que comprende ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico para tratar células de cáncer de próstata positivo para PSMA.

Ligadores

Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender uno o más ligadores. Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender dos o más ligadores. Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender tres o más ligadores. Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender cuatro o más ligadores. Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más ligadores. Los dos o más ligadores pueden ser iguales. Al menos dos de los tres o más ligadores pueden ser iguales. Los dos o más ligadores pueden ser diferentes. Al menos dos de los tres o más ligadores pueden ser diferentes.

Los productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender uno o más ligadores. Los productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender dos o más ligadores. Los productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender tres o más ligadores. Los productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender cuatro o más ligadores. Los productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más ligadores. Los dos o más ligadores pueden ser iguales. Al menos dos de los tres o más ligadores pueden ser iguales. Los dos o más ligadores pueden ser diferentes. Al menos dos de los tres o más ligadores pueden ser diferentes.

La figura 18 representa ligadores a modo de ejemplo. La figura 19 representa ligadores heterobifuncionales a modo de ejemplo. La figura 20 muestra un esquema general para sintetizar ligadores bifuncionales. Pueden encontrarse ligadores a modo de ejemplo adicionales y métodos de construcción de ligadores en el documento WO2014/153002.

El ligador puede unirse a un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID). El ligador puede unirse a un dominio de interacción con la diana (TID). El ligador puede unir un CAR-ID a un TID. El uno o más ligadores pueden unir el uno o más CAR-ID al uno o más TID. El uno o más ligadores pueden unir el uno o más CAR-ID al uno o más TID de manera específica de sitio. La unión de manera específica de sitio puede comprender unir el uno o más CAR-ID a un sitio predeterminado en el uno o más TID. Alternativa o adicionalmente, la unión de manera específica de sitio puede comprender unir el uno o más CAR-ID a un aminoácido no natural en el uno o más TID. El uno o más ligadores pueden unir el uno o más CAR-ID al uno o más TID de una manera independiente del sitio. La unión de una manera independiente del sitio puede comprender unir el uno o más CAR-ID a un sitio aleatorio en el uno o más TID. El CAR-ID puede unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o más TID de manera específica de sitio. El CAR-ID puede unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o más TID de una manera independiente de sitio. Alternativamente, el TID puede unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o más CAR-ID de manera específica de sitio. La unión de manera específica de sitio puede comprender unir el uno o más TID a un sitio predeterminado en el uno o más CAR-ID. El TID puede unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o más CAR-ID de una manera independiente de sitio. La unión de una manera independiente de sitio puede comprender unir el uno o más TID a un sitio aleatorio en el uno o más CAR-ID.

El uno o más ligadores pueden acoplarse al CAR-ID, el TID o una combinación de los mismos. El uno o más ligadores pueden acoplarse al CAR-ID para formar uno o más productos intermedios de interruptores de fórmula IIA: L1-X o fórmula II: X-L1, en la que X es el CAR-ID y L1 es el ligador. El uno o más ligadores pueden acoplarse al CAR-ID mediante una oxima. El uno o más ligadores pueden acoplarse al CAR-ID mediante un ciclooctino, ciclopropeno, aril/alquilazidas, trans-cicloocteno, norboreno, tetrazina, o una combinación de los mismos. El uno o más ligadores pueden acoplarse al CAR-ID mediante un enlace covalente, enlace no covalente, enlace iónico, o una combinación de los mismos. El uno o más ligadores pueden acoplarse al TID para formar uno o más productos intermedios de interruptores de fórmula IIIA: L1-Y o fórmula III: Y-L1, en la que Y es el TID y L1 es el ligador. El uno o más ligadores pueden acoplarse al TID mediante una oxima. El uno o más ligadores pueden acoplarse al TID mediante un ciclooctino, ciclopropeno, aril/alquilazidas, trans-cicloocteno, norboreno, tetrazina, o una combinación de los mismos. El uno o más ligadores pueden acoplarse al TID mediante un enlace covalente, enlace no covalente, enlace iónico, o una combinación de los mismos.

El TID puede comprender uno o más aminoácidos. El uno o más aminoácidos pueden comprender un aminoácido natural. El ligador puede acoplarse con uno o más aminoácidos naturales en el TID. El uno o más aminoácidos pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales. El ligador puede acoplarse con uno o más aminoácidos no naturales en el TP. El ligador puede acoplarse con un aminoácido que es el producto de mutagénesis específica de sitio. El ligador puede acoplarse con una cisteína que es el producto de mutagénesis específica de sitio. El ligador (por ejemplo, maleimida sustituida) puede acoplarse con una cisteína que es el producto de mutagénesis específica de sitio, así como un residuo de cisteína nativo. Dos ligadores, cada uno con grupos funcionales reactivos complementarios,

pueden acoplarse entre sí.

El uno o más ligadores pueden ser un ligador escindible. El uno o más ligadores pueden ser un ligador no escindible. El uno o más ligadores pueden ser un ligador flexible. El uno o más ligadores pueden ser un ligador inflexible. El ligador puede ser un ligador bifuncional. Un ligador bifuncional puede comprender un primer grupo funcional en un extremo y un segundo grupo funcional en el segundo extremo. El ligador bifuncional puede ser un ligador heterobifuncional. Un ligador heterobifuncional puede comprender un primer grupo funcional en un extremo y un segundo grupo funcional en el segundo extremo, en el que el primer grupo funcional y el segundo grupo funcional son diferentes. El ligador bifuncional puede ser un ligador homobifuncional. Un ligador homobifuncional puede comprender un primer grupo funcional en un extremo y un segundo grupo funcional en el segundo extremo, en el que el primer grupo funcional y el segundo grupo funcional son iguales.

El ligador puede comprender un enlace químico. El ligador puede comprender un grupo funcional. El ligador puede comprender un polímero. El polímero puede ser un polietilenglicol. El ligador puede comprender un aminoácido.

El ligador puede comprender uno o más grupos funcionales. El ligador puede comprender dos o más grupos funcionales. El ligador puede comprender tres o más grupos funcionales. El ligador puede comprender cuatro o más grupos funcionales. El ligador puede comprender 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más grupos funcionales. El ligador puede ser un ligador de etilenglicolbifuncional.

El ligador puede comprender etilenglicol. El ligador puede comprender aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19 o aproximadamente 20 o más subunidades de etilenglicol. El ligador puede comprender 4 o más subunidades de etilenglicol. El ligador puede comprender 8 o más subunidades de etilenglicol. El ligador puede comprender 10 o más subunidades de etilenglicol. El ligador puede comprender 12 o más subunidades de etilenglicol. El ligador puede comprender 15 o más subunidades de etilenglicol. El ligador puede comprender 20 o más subunidades de etilenglicol. El ligador puede comprender 25 o más subunidades de etilenglicol. El ligador puede comprender 30 o más subunidades de etilenglicol. El ligador puede comprender 35 o más subunidades de etilenglicol.

El ligador puede comprender polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19 o aproximadamente 20 o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 4 o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 8 o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 10 o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 12 o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 15 o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 20 o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 25 o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 30 o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 35 o más subunidades de polietilenglicol (PEG).

El ligador puede comprender un triazol. El triazol puede ser un 1,2,3-triazol. El triazol puede ser un 1,2,4-triazol.

El ligador puede comprender un arilo o un heteroarilo. El ligador puede comprender un arilo. El arilo puede ser fenilo. El fenilo puede estar disustituido. El fenilo disustituido puede ser fenilo 1,4-disustituido. El fenilo disustituido puede ser fenilo 1,3-disustituido. El fenilo puede estar trisustituido. El fenilo puede estar tetrasustituido. Dos de los sustituyentes del fenilo sustituido pueden ser NO₂. En algunos casos, el ligador no comprende un sustituyente de bencilo.

El ligador puede comprender una o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender múltiples unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 2 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 3 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 4 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 5 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 6 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 7 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 8 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 9 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 10 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 11 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 12 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 13 o más unidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender 14 o más unidades de polietilenglicol (PEG).

El ligador puede comprender una amida en un extremo. El ligador puede comprender una amida en un extremo y una amina en el otro extremo. El ligador puede comprender una amida en un extremo y un triazol en el otro extremo.

El uno o más ligadores pueden comprender un resto 1,4-dicarboxílico. El uno o más ligadores pueden comprender un resto de fenilo sustituido con 1,3-dinitro.

5 El uno o más ligadores pueden comprender uno o más grupos funcionales reactivos. El grupo funcional reactivo puede reaccionar con un grupo funcional reactivo complementario en una pareja de acoplamiento. La reacción del grupo funcional reactivo en el ligador con un grupo funcional reactivo complementario en una pareja de acoplamiento puede producirse antes de la incorporación del ligador en el interruptor de CAR-EC.

10 El ligador puede comprender al menos un grupo funcional reactivo seleccionado de alcoxi-amina, hidrazina, aril/alquilazida, alquino, alqueno, tetrazina, diclorotriazina, tresilato, carbonato de succinimidilo, carbonato de benzotriazol, carbonato de nitrofenilo, carbonato de triclorofenilo, carbonilimidazol, succinato de succinimidilo, maleimida, vinilsulfona, haloacetamida y disulfuro. El alqueno puede seleccionarse de norborneno, trans-cicloocteno y ciclopropeno. El ligador puede comprender al menos una alcoxilamina. El ligador puede comprender al menos una azida. El ligador puede comprender al menos un ciclooctino. El ligador puede comprender al menos una tetrazina.

15 El uno o más ligadores pueden comprender un grupo alcoxi-amina (o aminoóxido), grupo azida y/o grupo ciclooctino en uno o más extremos terminales. El uno o más ligadores pueden comprender una alcoxi-amina en un extremo terminal y un grupo azida en el otro extremo terminal. El uno o más ligadores pueden comprender una alcoxi-amina en un extremo terminal y un grupo ciclooctino en el otro extremo terminal. La alcoxi-amina puede formar una oxima estable con un grupo cetona en un aminoácido. La alcoxi-amina puede formar una oxima estable con un grupo cetona en un aminoácido no natural. El grupo cetona puede estar en una p-acetilfenilalanina (pAcF).

20 Uno o más ligadores pueden formarse mediante reacción del grupo funcional reactivo en el CAR-ID con un grupo funcional reactivo complementario de un ligador que está unido al TID. Uno o más ligadores pueden formarse mediante reacción de un aminoácido u otro grupo funcional reactivo en el TID con un grupo funcional reactivo complementario de un ligador que está unido al CAR-ID. Uno o más ligadores pueden formarse mediante reacción de un ligador que está unido al CAR-ID con otro ligador que está unido al TID. La figura 16 muestra un esquema de la producción de un ligador mediante reacción de grupos funcionales reactivos en dos productos intermedios de interruptores. Tal como se muestra en la figura 16, un primer producto intermedio de interruptor (1601) que comprende un CAR-ID (1605) y un primer ligador (1610) se pone en contacto con un segundo producto intermedio de interruptor (1620) que comprende un TID (1625) y un segundo ligador (1630). El grupo funcional reactivo (1615) del primer ligador (1610) reacciona con el segundo grupo funcional (1635) del segundo ligador (1635) para producir un nuevo ligador (1645). La reacción de los dos productos intermedios de interruptores (1601, 1620) da como resultado la formación de un interruptor (1640) que comprende el CAR-ID (1605) conectado al TID (1625) por medio del nuevo ligador (1645).

35 El ligador puede ser el producto de una reacción bioortogonal. Por ejemplo, aminoácidos que contienen cadenas laterales de cetona, azida, alquino, alqueno y tetrazina pueden estar codificados genéticamente en respuesta a codones sin sentido y de cambio de sentido. Estas cadenas laterales pueden actuar como asas químicas para reacciones de conjugación biortogonales (Kim *et al.*, Curr Opin Chem Bio 17:412-419 (2013)). El ligador puede comprender una oxima, un tetrazol, un aducto de Diels Alder, un heteroaducto de Diels Alder, un producto de reacción de sustitución aromática, un producto de reacción de sustitución nucleofílica, un éster, una amida, un carbamato, un éter, un tioéter o un producto de reacción de Michael. El ligador puede ser un producto de cicloadición, un producto de reacción de metátesis, un producto de reacción de acoplamiento cruzado mediada por metal, un producto de polimerización de radicales, un producto de acoplamiento oxidativo, un producto de reacción de transferencia de acilos o un producto de fotorreacción "click". La cicloadición puede ser una cicloadición de Huisgen. La cicloadición puede ser una cicloadición de Huisgen [3+2] libre de cobre. La cicloadición puede ser una reacción de Diels-Alder. La cicloadición puede ser una heterorreacción de Diels-Alder. El ligador puede ser el producto de una reacción mediada por enzimas. El ligador puede ser un producto de una reacción mediada por transglutaminasa, cuyos ejemplos no limitativos se describen en Lin *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 128:4542-4543 (2006) y el documento WO 2013/093809. El ligador puede comprender un puente disulfuro que conecta dos residuos de cisteína, tal como la tecnología ThioBridge™ de PolyTherics. El ligador puede comprender un puente maleimida que conecta dos residuos de aminoácido. El ligador puede comprender un puente maleimida que conecta dos residuos de cisteína.

40 Dos o más ligadores pueden unirse. Los dos o más ligadores pueden unirse a través de una o más reacciones libres de cobre. Los dos o más ligadores pueden unirse a través de una o más cicloadiciones. Los dos o más ligadores pueden unirse a través de una o más cicloadiciones de Huisgen. Los dos o más ligadores pueden unirse a través de una o más cicloadiciones de Huisgen [3+2] libres de cobre. Los dos o más ligadores pueden unirse a través de una o más reacciones que contienen cobre. Los dos o más ligadores pueden unirse a través de una o más reacciones de Diels Alder. Los dos o más ligadores pueden unirse a través de una o más heterorreacciones de Diels Alder.

50 Los interruptores de CAR-EC pueden optimizarse ajustando la longitud del ligador. Los interruptores de CAR-EC pueden comprender ligadores de diferentes longitudes. Los ligadores pueden ser relativamente cortos. Los ligadores pueden ser relativamente largos. El uno o más ligadores pueden ser de entre aproximadamente 1 angstrom (Å) y aproximadamente 120 angstroms (Å) de longitud. El uno o más ligadores pueden ser de entre aproximadamente 5 angstroms (Å) y aproximadamente 105 angstroms (Å) de longitud. El uno o más ligadores pueden ser de entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 100 angstroms (Å) de longitud. El uno o más ligadores pueden

ser de entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 90 angstroms (Å) de longitud. El uno o más ligadores pueden ser de entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 80 angstroms (Å) de longitud. El uno o más ligadores pueden ser de entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 70 angstroms (Å) de longitud. El uno o más ligadores pueden ser de entre aproximadamente 15 angstroms (Å) y aproximadamente 45 angstroms (Å) de longitud. El uno o más ligadores pueden ser iguales o mayores de aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 27, 30 o más angstroms de longitud. El uno o más ligadores pueden ser iguales o mayores de aproximadamente 10 angstroms de longitud. El uno o más ligadores pueden ser iguales o mayores de aproximadamente 15 angstroms de longitud. El uno o más ligadores pueden ser iguales o mayores de aproximadamente 20 angstroms de longitud. El uno o más ligadores pueden ser iguales o menores de aproximadamente 110, 100, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30 o menos angstroms de longitud. El uno o más ligadores pueden ser iguales o menores de aproximadamente 100 angstroms de longitud. El uno o más ligadores pueden ser iguales o menores de aproximadamente 80 angstroms de longitud. El uno o más ligadores pueden ser iguales o menores de aproximadamente 60 angstroms de longitud. El uno o más ligadores pueden ser iguales o menores de aproximadamente 40 angstroms de longitud.

La longitud total de los ligadores puede ser de entre aproximadamente 1 angstrom (Å) y aproximadamente 120 angstroms (Å). La longitud total de los ligadores puede ser de entre aproximadamente 5 angstroms (Å) y aproximadamente 105 angstroms (Å). La longitud total de los ligadores puede ser de entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 100 angstroms (Å). La longitud total de los ligadores puede ser de entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 90 angstroms (Å). La longitud total de los ligadores puede ser de entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 80 angstroms (Å). La longitud total de los ligadores puede ser de entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 70 angstroms (Å). La longitud total de los ligadores puede ser de entre aproximadamente 15 angstroms y aproximadamente 45 angstroms (Å). La longitud total de los ligadores puede ser igual o mayor de aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 27, 30 o más angstroms. La longitud total de los ligadores puede ser igual o mayor de aproximadamente 10 angstroms. La longitud total de los ligadores puede ser igual o mayor de aproximadamente 15 angstroms. La longitud total de los ligadores puede ser igual o mayor de aproximadamente 20 angstroms. La longitud total de los ligadores puede ser igual o menor de aproximadamente 110, 100, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30 o menos angstroms. La longitud total de los ligadores puede ser igual o menor de aproximadamente 100 angstroms. La longitud total de los ligadores puede ser igual o menor de aproximadamente 80 angstroms. La longitud total de los ligadores puede ser igual o menor de aproximadamente 60 angstroms. La longitud total de los ligadores puede ser igual o menor de aproximadamente 40 angstroms. La longitud total de los ligadores puede ser igual o menor de aproximadamente 25 Å. La distancia entre el CAR-ID y el TID puede ser de aproximadamente 30 Å.

Se dan a conocer en el presente documento composiciones que comprenden una pluralidad de interruptores, en las que un interruptor de la pluralidad de interruptores comprende (a) un CAR-ID; (b) un TID; y (c) un ligador, en las que al menos aproximadamente el 60% de los interruptores de la pluralidad de interruptores son estructuralmente homogéneos. Al menos aproximadamente el 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68% o el 69% de los interruptores de la pluralidad de interruptores pueden ser estructuralmente homogéneos. Al menos aproximadamente el 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% o el 79% de los interruptores de la pluralidad de interruptores pueden ser estructuralmente homogéneos. Al menos aproximadamente el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% o el 89% de los interruptores de la pluralidad de interruptores pueden ser estructuralmente homogéneos. Al menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de los interruptores de la pluralidad de interruptores pueden ser estructuralmente homogéneos. Pueden proporcionarse interruptores de CAR-EC estructuralmente homogéneos para unir de manera específica de sitio el CAR-ID y el TID. El ligador puede unirse a un CAR-ID de manera específica de sitio. El ligador puede unirse a un TID de manera específica de sitio. Un primer sitio del ligador puede unirse a un CAR-ID de manera específica de sitio y un segundo sitio del ligador puede unirse a un TID de manera específica de sitio.

Métodos de producción de interruptores y productos intermedios de interruptores

Se dan a conocer en el presente documento métodos de producción de interruptores de CAR-EC. Generalmente, el método comprende unir un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) a un dominio de interacción con la diana (TID). Alternativamente, el método puede comprender unir un producto intermedio de interruptor que comprende un CAR-ID y un ligador a un TID. El método puede comprender unir un producto intermedio de interruptor que comprende un TID y un ligador a un CAR-ID. El método puede comprender unir un primer producto intermedio de interruptor que comprende un CAR-ID y un primer ligador a un segundo interruptor que comprende un TID y un segundo ligador. La unión del CAR-ID al TID puede producirse de manera específica de sitio. La unión de manera específica de sitio puede comprender unir el CAR-ID a un sitio predeterminado en el TID. La unión de manera específica de sitio puede comprender unir el TID a un sitio predeterminado en el CAR-ID. La unión del CAR-ID al TID puede producirse de una manera independiente del sitio. La unión de una manera independiente del sitio puede comprender unir el CAR-ID a un sitio aleatorio en el TID. La unión de una manera independiente del sitio puede comprender unir el TID a un sitio aleatorio en el CAR-ID. El método puede comprender además unir uno o más CAR-ID adicionales al TID. El método puede comprender además unir o más TID adicionales al CAR-ID. El método puede comprender además usar uno o más ligadores adicionales para conectar el TID al CAR-ID. Unir el CAR-ID al TID

puede comprender realizar una o más reacciones químicas.

5 El método de producción de un interruptor puede comprender unir un TID basado en o derivado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo a un CAR-ID o un producto intermedio de interruptor que comprende un CAR-ID para producir un interruptor de CAR-EC que comprende (a) el TID; (b) uno o más ligadores; y (c) el CAR-ID, el uno o más ligadores pueden unir el TID al CAR-ID. Unir el TID al CAR-ID puede producirse de manera específica de sitio. El CAR-ID puede unirse a un sitio predeterminado en el TID por medio del uno o más ligadores. El TID puede unirse a un sitio predeterminado en el CAR-ID por medio del uno o más ligadores.

10 Se dan a conocer en el presente documento métodos de producción de un interruptor de fórmula I: X-L1-Y o fórmula IA: Y-L1-X, en la que X es un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID), Y es un dominio de interacción con la diana (TID) y L1 es un ligador. X puede ser una molécula pequeña de unión a CAR e Y puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. X puede ser una molécula pequeña de unión a CAR que no comprende un péptido e Y puede ser un péptido que no comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. X puede ser una molécula pequeña de unión a CAR que no comprende un péptido e Y puede ser una molécula pequeña de direccionamiento que no comprende un péptido. El método puede comprender realizar una o más reacciones para unir el CAR-ID a un sitio predeterminado en el TID. Realizar la una o más reacciones para unir el CAR-ID al TID puede comprender mezclar una pluralidad de CAR-ID con una pluralidad de TID. El método puede comprender unir un extremo del ligador al TID, seguido por la unión del otro extremo del ligador al CAR-ID. El método puede comprender unir un extremo del ligador al CAR-ID, seguido por la unión del otro extremo del ligador al TID. La unión del ligador al TID puede producirse de manera específica de sitio. El ligador puede unirse a un aminoácido predeterminado del TID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. El ligador puede comprender un grupo funcional que interacciona con el aminoácido. La unión del ligador al TID puede producirse de una manera independiente del sitio. El ligador puede unirse aleatoriamente al TID. El ligador puede comprender un grupo funcional que reacciona con un grupo funcional en el TID. La unión del ligador al CAR-ID puede producirse de manera específica de sitio. La unión del ligador al CAR-ID puede producirse de una manera independiente del sitio. El ligador puede comprender un grupo funcional que reacciona con un grupo funcional en el CAR-ID. La realización de una o más reacciones para unir el CAR-ID al TID puede comprender realizar una ligación de oxima.

30 Alternativa o adicionalmente, el método puede comprender realizar una reacción para unir el ligador o un precursor del ligador al CAR-ID para producir un producto intermedio de interruptor que comprende el ligador conjugado con el CAR-ID. El producto intermedio de interruptor puede tener la fórmula II: X-L1 o fórmula IIA: L1-X, en la que X es el CAR-ID y L1 es el ligador o precursor del ligador. El ligador puede conjugarse con el CAR-ID de manera específica de sitio. El ligador puede conjugarse con el CAR-ID de una manera independiente del sitio. La realización de la una o más reacciones para unir el CAR-ID al TID puede comprender unir la porción de ligador del producto intermedio de interruptor al TID. La realización de la una o más reacciones para unir el CAR-ID al TID puede comprender poner en contacto una pluralidad de productos intermedios de interruptores que comprenden el ligador o precursor de ligador conjugado con el CAR-ID con una pluralidad de TID. La unión de la porción de ligador del producto intermedio de interruptor al TID puede producirse de manera específica de sitio. El TID puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. La porción de ligador del interruptor puede unirse al TID por medio del uno o más aminoácidos no naturales. La unión de la porción de ligador del producto intermedio de interruptor puede producirse de una manera independiente del sitio.

45 Alternativa o adicionalmente, el método puede comprender realizar una reacción para unir el ligador o un precursor del ligador al TID para producir un producto intermedio de interruptor que comprende el ligador o precursor del ligador conjugado con el TID. El producto intermedio de interruptor puede ser de fórmula III: Y-L1 o fórmula IIIA: L1-Y, en la que Y es el TID y L1 es el ligador o precursor de ligador. El ligador puede conjugarse con el TID de manera específica de sitio. El ligador puede conjugarse con el TID de una manera independiente del sitio. La realización de la una o más reacciones para unir el CAR-ID al TID puede comprender unir la porción de ligador del producto intermedio de interruptor al CAR-ID. La realización de la una o más reacciones para unir el CAR-ID al TID puede comprender poner en contacto una pluralidad de productos intermedios de interruptores que comprenden el ligador o precursor de ligador conjugado con el TID con una pluralidad de CAR-ID. La unión de la porción de ligador del producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede producirse de manera específica de sitio. La unión de la porción de ligador del producto intermedio de interruptor puede producirse de una manera independiente del sitio.

55 El método puede comprender acoplar uno o más ligadores al TID para producir un producto intermedio de interruptor de fórmula III: Y-L1 o fórmula IIIA: L1-Y, en la que Y es el TID y L1 es el ligador; y conjugar el producto intermedio de interruptor con el CAR-ID, produciendo de ese modo el interruptor de CAR-EC. El producto intermedio de interruptor puede conjugarse con el CAR-ID de una manera específica de sitio. El producto intermedio de interruptor puede conjugarse con el CAR-ID de una manera independiente del sitio. El método puede comprender además incorporar uno o más aminoácidos no naturales en el CAR-ID y/ o TID. El producto intermedio de interruptor puede conjugarse con el CAR-ID de manera específica de sitio a través del uso del aminoácido no natural.

65 El método puede comprender acoplar uno o más ligadores al CAR-ID para producir un producto intermedio de interruptor de fórmula II: X-L1 o fórmula IIA: L1-X, en la que X es el CAR-ID y L1 es el ligador; y conjugar el producto intermedio de interruptor al TID, produciendo de ese modo el interruptor de CAR-EC. El producto intermedio de

interruptor puede conjugarse con el TID de manera específica de sitio. El producto intermedio de interruptor puede conjugarse con el TID de una manera independiente del sitio. El método puede comprender además incorporar uno o más aminoácidos no naturales en el CAR-ID y/o TID. El producto intermedio de interruptor puede conjugarse con el TID de manera específica de sitio a través del uso del aminoácido no natural.

5 Conjugar el producto intermedio de interruptor de fórmula II: X-L1 o fórmula IIA: L1-X, en la que X es el CAR-ID y L1, con el TID puede comprender formar una oxima. Conjugar el producto intermedio de interruptor de fórmula III: Y-L1 o fórmula IIIA: L1-Y, en la que Y es el TID y L1, con el CAR-ID puede comprender formar una oxima. Formar una oxima puede comprender realizar una o más reacciones en condiciones ácidas. Formar una oxima puede comprender realizar una o más reacciones en condiciones ligeramente ácidas. Formar una oxima puede comprender realizar una o más reacciones en condiciones ligeramente neutras.

15 Un método de producción de un interruptor puede comprender (a) producir un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural; (b) unir un primer ligador al TID para producir un primer producto intermedio de interruptor que comprende el TID y el primer ligador; (c) unir un segundo producto intermedio de interruptor que comprende un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) y un segundo ligador con el primer producto intermedio de interruptor, produciendo de ese modo el interruptor. El aminoácido no natural puede ser p-acetilfenalanina (pAcF). El TID puede comprender un polipéptido basado en o derivado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD 19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD 19. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-EGFR. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD20. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-HER2. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El anticuerpo puede estar codificado por un nucleótido secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El primer ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El primer ligador puede comprender ciclooctino. El primer ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender una azida. El primer ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser 1,2,3-triazol. El triazol puede ser 1,2,4-triazol. El primer ligador puede comprender un ligador de azida-PEG-aminooxilo. El primer ligador puede unirse a una cetona del aminoácido no natural. El primer ligador puede unirse al TID por medio de ligación de oxima. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. El CAR-ID puede comprender FITC. El segundo ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El segundo ligador puede comprender ciclooctino. El segundo ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender una azida. El segundo ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser 1,2,3-triazol. El triazol puede ser 1,2,4-triazol. El segundo ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El segundo producto intermedio de interruptor puede unirse al primer producto intermedio de interruptor por medio de una reacción de química "click". El segundo producto intermedio de interruptor puede unirse al primer producto intermedio de interruptor a través de una reacción de cicloadición. La reacción de cicloadición puede ser una reacción de cicloadición [3+2].

45 Conjugar el ligador al CAR-ID para producir el interruptor puede comprender formar uno o más enlaces entre el ligador y el CAR-ID. Conjugar el ligador al TID para producir el interruptor puede comprender formar uno o más enlaces entre el ligador y el TID. El uno o más enlaces pueden comprender un enlace iónico, un enlace covalente, un enlace no covalente o una combinación de los mismos. Pueden realizarse métodos de conjugación adicionales del ligador al CAR-ID y el TID tal como se describe en Roberts *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:459-476 (2002), que se incluye como referencia en su totalidad.

50 El CAR-ID puede comprender cualquiera de los CAR-ID dados a conocer en el presente documento. Por ejemplo, el CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. El CAR-ID puede comprender FITC. El CAR-ID puede seleccionarse del grupo que consiste en DOTA, dinitrofenol, quinona, biotina, anilina, atrazina, un derivado de anilina, ácido o-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido m-aminobenzoico, hidralazina, halotano, digoxigenina, arsonato de benceno, lactosa, trinitrofenol, biotina y derivados de los mismos. El TID puede comprender cualquiera de los TID dados a conocer en el presente documento. Por ejemplo, el TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. El TID puede comprender folato. El TID puede basarse en o derivarse de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender anti-CD 19. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-BMSA, anti-CEA, anti-CLL1, anti-CS1, anti-EGFR y anti-Her2. El ligador puede comprender cualquiera de los ligadores dados a conocer en el presente documento. Por ejemplo, el ligador puede comprender un grupo aminooxilo, grupo azida, grupo ciclooctino, o una combinación de los mismos en uno o más extremos terminales. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de PEG.

65 Se dan a conocer en el presente documento métodos de producción de un interruptor de fórmula IV: X-L1-L2-Y, en la que en X es un CAR-ID, L1 es un primer ligador, L2 es un segundo ligador e Y es un TID. El método puede comprender

(a) acoplar L1 a X para producir un primer producto intermedio de interruptor de fórmula II: X-L1; (b) acoplar L2 a Y para producir un segundo producto intermedio de interruptor de fórmula V: L2-Y; y (c) unir el primer producto intermedio de interruptor de fórmula II al segundo producto intermedio de interruptor de fórmula V, produciendo de ese modo el interruptor de fórmula IV.

5 Se dan a conocer en el presente documento métodos de producción de un interruptor de fórmula IVA: Y-L2-L1-X, en la que Y es un TID, L1 es un primer ligador, L2 es un segundo ligador y X es un CAR-ID. El método puede comprender (a) acoplar L1 a X para producir un primer producto intermedio de interruptor de fórmula IIA: L1-X; (b) acoplar L2 a Y para producir un segundo producto intermedio de interruptor de fórmula VA: Y-L2; y (c) unir el primer producto intermedio de fórmula IIA al segundo producto intermedio de fórmula VA, produciendo de ese modo el interruptor de CAR-ID de fórmula IVA.

15 Los métodos pueden comprender además incorporar uno o más aminoácidos no naturales en X y/o Y. El L1 puede acoplarse a X de manera específica de sitio. El L1 puede acoplarse a X de manera específica de sitio a través del uno o más aminoácidos no naturales. L2 puede acoplarse a Y de manera específica de sitio. El L2 puede acoplarse a Y de manera específica de sitio a través del uno o más aminoácidos no naturales. El método puede comprender además modificar un ácido nucleico que codifica para X para producir uno o más codones ámbar en X. El método puede comprender además modificar un ácido nucleico que codifica para Y para producir uno o más codones ámbar en Y.

20 Conjuguar el ligador al CAR-ID para producir el primer producto intermedio de interruptor puede comprender formar uno o más enlaces entre el ligador y el CAR-ID. Conjuguar el ligador al TID para producir el segundo producto intermedio de interruptor puede comprender formar uno o más enlaces entre el ligador y el TID. El uno o más enlaces pueden comprender un enlace iónico, un enlace covalente, un enlace no covalente o una combinación de los mismos. Pueden realizarse métodos adicionales de conjugación del ligador al CAR-ID y el TID tal como se describe en Roberts *et al.*, Advanced Drug Delivery Reviews 54:459-476 (2002), que se incluye como referencia en su totalidad.

30 Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una cicloadición de Huisgen, una reacción de Diels-Halder, una heterorreacción de Diels-Alder o una reacción mediada por enzimas. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede producir una oxima, un tetrazol, un aducto de Diels Alder, un heteroaducto de Diels Alder, un producto de reacción de sustitución aromática, un producto de reacción de sustitución nucleofílica, un éster, una amida, un carbamato, un éter, un tioéter, un producto de reacción de Michael, un producto de cicloadición, un producto de reacción de metátesis, un producto de reacción de acoplamiento cruzado mediada por metal, un producto de polimerización por radicales, un producto de acoplamiento oxidativo, un producto de reacción de transferencia de acilos o un producto de fotorreacción "click". Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede producir un puente disulfuro o un puente maleimida.

40 L1 y/o L2 pueden comprender un ligador seleccionado de un ligador bifuncional, un ligador escindible, un ligador no escindible, un ligador de etilenglicol, un ligador de etilenglicol bifuncional, un ligador flexible o un ligador inflexible. L1 y/o L2 pueden comprender un ligador seleccionado del grupo que comprende ciclooctino, ciclopropeno, aril/alquilazidas, trans-cicloocteno, norboreno y tetrazinas. Un extremo terminal de L1 y/o un extremo terminal de L2 pueden comprender una alcoxi-amina. Un extremo terminal de L1 y/o un extremo terminal de L2 pueden comprender una azida o grupo ciclooctino. X puede acoplarse a L1 mediante un grupo químico seleccionado de un ciclooctino, ciclopropeno, aril/alquilazida, trans-cicloocteno, norboreno y tetrazina. Unir el primer producto intermedio de interruptor (X-L1 o L1-X) y el segundo producto intermedio de interruptor (Y-L2 o L2-Y) puede comprender realizar una o más reacciones libres de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor (X-L1 o L1-X) y el segundo producto intermedio de interruptor (Y-L2 o L2-Y) puede comprender realizar una o más reacciones que contienen cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor (X-L1 o L1-X) y el segundo producto intermedio de interruptor (Y-L2 o L2-Y) puede comprender una o más cicloadiciones. Unir el primer producto intermedio de interruptor (X-L1 o L1-X) y el segundo producto intermedio de interruptor (Y-L2 o L2-Y) puede comprender una o más cicloadiciones de Huisgen. Unir el primer producto intermedio de interruptor (X-L1 o L1-X) y el segundo producto intermedio de interruptor (Y-L2 o L2-Y) puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor (X-L1 o L1-X) y el segundo producto intermedio de interruptor (Y-L2 o L2-Y) puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder.

55 Los métodos dados a conocer en el presente documento pueden comprender acoplar uno o más ligadores a uno o más TID, CAR-ID o combinaciones de los mismos para producir uno o más productos intermedios de interruptores. El producto intermedio de interruptor puede comprender un TID unido a un ligador (por ejemplo, producto intermedio de interruptor de TID). El producto intermedio de interruptor puede comprender un CAR-ID unido a un ligador (por ejemplo, productos intermedios de interruptores de CAR-ID). Los métodos pueden comprender acoplar un primer ligador un TID para producir un producto intermedio de interruptor de TID. Los métodos pueden comprender acoplar un ligador a un CAR-ID para producir un producto intermedio de interruptor de CAR-ID.

65 El acoplamiento del uno o más ligadores al TID y el CAR-ID puede producirse simultáneamente. El acoplamiento del uno o más ligadores al TID y el CAR-ID puede producirse secuencialmente. El acoplamiento del uno o más ligadores al TID y el CAR-ID puede producirse en un único volumen de reacción. El acoplamiento del uno o más ligadores al

TID y el CAR-ID puede producirse en dos o más volúmenes de reacción.

El acoplamiento de uno o más ligadores al TID y/o el CAR-ID puede comprender formar una o más oximas entre el ligador y el TID y/o el CAR-ID. El acoplamiento de uno o más ligadores al TID y/o el CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces estables entre el ligador y el TID y/o el CAR-ID. El acoplamiento de uno o más ligadores al TID y/o el CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces covalentes entre el ligador y el TID y/o el CAR-ID. El acoplamiento de uno o más ligadores al TID y/o el CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces no covalentes entre el ligador y TID y/o el CAR-ID. El acoplamiento de uno o más ligadores al TID y/o el CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces iónicos entre el ligador y el TID y/o el CAR-ID.

El acoplamiento de uno o más ligadores al TID y/o el CAR-ID puede comprender acoplar de manera específica de sitio uno o más ligadores al TID y/o el CAR-ID. El acoplamiento específico de sitio puede comprender unir el uno o más ligadores al aminoácido no natural del TID y/o el CAR-ID. Unir el uno o más ligadores al aminoácido no natural del TID y/o el CAR-ID puede comprender la formación de una oxima. Unir el uno o más ligadores al aminoácido no natural del TID y/o el CAR-ID puede comprender, a modo de ejemplo no limitativo, hacer reaccionar una hidroxilamina del uno o más ligadores con un aldehído o cetona de un aminoácido. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural.

Realizar la una o más reacciones para unir de manera específica de sitio el CAR-ID al TID, para unir de manera específica de sitio el ligador o un precursor del ligador al CAR-ID, para unir de manera específica de sitio el ligador o un precursor del ligador al TID, para unir de manera específica de sitio el producto intermedio de interruptor de CAR-ID al TID, para unir de manera específica de sitio el producto intermedio de interruptor de TID al CAR-ID o para unir de manera específica de sitio el producto intermedio de interruptor de TID al producto intermedio de interruptor de CAR-ID puede comprender realizar una o más reacciones seleccionadas de una reacción libre de cobre, unas cicloadiciones, una cicloadición de Huisgen, una cicloadición de Huisgen [3+2] libre de cobre, una reacción que contiene cobre, unas reacciones de Diels Alder, una heterorreacción de Diels Alder, reacción de metátesis, una reacción de acoplamiento cruzado mediada por metal, una polimerización por radicales, un acoplamiento oxidativo, una reacción de transferencia de acilos, una fotorreacción "click", una reacción mediada por enzimas, una reacción mediada por transglutaminasa.

Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden comprender un CAR-ID que comprende FITC o un derivado del mismo. El método de producción de tales interruptores puede comprender acoplar un ligador o precursor del mismo, un producto intermedio de interruptor que comprende un TID (por ejemplo, producto intermedio de interruptor de TID) o un TID al CAR-ID. Acoplar el ligador o precursor del mismo, el producto intermedio de interruptor de TID al CAR-ID puede comprender la conjugación de un isotiocianato de FITC al ligador o precursor del mismo, el producto intermedio de interruptor de TID o el TID. El TID puede basarse en o derivarse de un polipéptido. El polipéptido puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Acoplar un TID al CAR-ID puede comprender conjugar el isotiocianato de FITC a un aminoácido del TID. El aminoácido puede ser una lisina. El método puede comprender acoplar uno o más CAR-ID al TID. El método puede comprender conjugar FITC a partir de dos o más CAR-ID con dos o más aminoácidos del TID. Los dos o más aminoácidos pueden ser lisina.

Producir un interruptor dado a conocer en el presente documento puede comprender acoplamiento de éster. El acoplamiento de éster puede comprender formar un enlace amida entre el CAR-ID y el TID. El acoplamiento de éster puede comprender formar un enlace amida entre un producto intermedio de interruptor y el TID. El producto intermedio de interruptor puede comprender un CAR-ID unido a un ligador. El enlace amida puede formarse entre el ligador del producto intermedio de interruptor y el TID. El ligador puede ser un ligador de NHS-éster. El enlace amida puede formarse entre el ligador del producto intermedio de interruptor y un aminoácido del TID. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. La molécula pequeña puede ser FITC. El TID puede basarse en o derivarse de un polipéptido. El polipéptido puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El TID puede comprender una molécula pequeña.

El método de producción de un interruptor dado a conocer en el presente documento puede comprender: (a) obtener un producto intermedio de interruptor que comprende (i) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID); y (ii) un ligador; y (b) poner en contacto el producto intermedio de interruptor con un dominio de interacción con la diana (TID), produciendo de ese modo el interruptor. Poner en contacto el producto intermedio de interruptor con el TID puede comprender realizar una reacción de acoplamiento de éster. El ligador puede comprender un ligador de NHS-éster. El TID puede comprender uno o más aminoácidos. Realizar la reacción de acoplamiento de éster puede comprender formar un enlace amida entre el ligador de NHS-éster del producto intermedio de interruptor y el uno o más aminoácidos del TID. El método puede comprender además producir una pluralidad de interruptores. Dos o más interruptores de la pluralidad de interruptores pueden comprender dos o más productos intermedios de interruptores unidos a dos o más diferentes aminoácidos del TID. Por ejemplo, un primer producto intermedio de interruptor puede unirse a un residuo de lisina de un primer TID y un segundo producto intermedio de interruptor puede unirse a un residuo de glicina de un segundo TID. Dos o más interruptores de la pluralidad de interruptores pueden comprender dos o más productos intermedios de interruptores unidos al mismo aminoácido del TID. Por ejemplo, los dos o más productos intermedios de interruptores pueden unirse a un residuo de lisina de un primer y segundo TID. Dos o más interruptores de la pluralidad de interruptores pueden comprender dos o más productos intermedios de interruptores unidos al mismo aminoácido ubicado en dos o más posiciones diferentes en el TID. Por ejemplo, un primer producto intermedio de interruptor puede unirse a la lisina 10 de un primer TID y el segundo producto intermedio de interruptor

puede unirse a la lisina 45 de un segundo TID. Dos o más interruptores de la pluralidad de interruptores pueden comprender dos o más productos intermedios de interruptores unidos al mismo aminoácido ubicado en la misma posición en el TID. Por ejemplo, un primer producto intermedio de interruptor puede unirse a la lisina 10 de un primer TID y el segundo producto intermedio de interruptor puede unirse a la lisina 10 de un segundo TID.

Los métodos de producción de un interruptor dados a conocer en el presente documento pueden comprender usar uno o más aminoácidos no naturales. El método puede comprender incorporar uno o más aminoácidos no naturales en el CAR-ID. El CAR-ID puede basarse en o derivarse de un polipéptido que puede interactuar con un receptor de antígeno quimérico en una célula efectora. El polipéptido puede ser un polipéptido no basado en anticuerpo. Generalmente, un polipéptido no basado en anticuerpo es un polipéptido que no comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El aminoácido no natural puede incorporarse en el polipéptido no basado en anticuerpo. El aminoácido no natural puede reemplazar a un aminoácido del polipéptido no basado en anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, el método puede comprender incorporar uno o más aminoácidos no naturales en el TID. El TID puede basarse en o derivarse de un polipéptido. El polipéptido puede ser un anticuerpo. El polipéptido puede ser un polipéptido no basado en anticuerpo. El aminoácido no natural puede incorporarse en el polipéptido. El aminoácido no natural puede reemplazar a un aminoácido del polipéptido.

El método de producción del interruptor puede comprender además modificar uno o más residuos de aminoácido en el polipéptido a partir del cual el CAR-ID se basa o se deriva. El método de producción del interruptor puede comprender modificar uno o más residuos de aminoácido en polipéptido a partir del cual el TID se basa o se deriva. Modificar el uno o más residuos de aminoácido puede comprender mutar uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido. Mutar el uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos codificante puede comprender alterar un codón que codifica para un aminoácido a un codón sin sentido.

Incorporar uno o más aminoácidos no naturales en el polipéptido a partir del cual el CAR-ID se basa o se deriva puede comprender modificar uno o más residuos de aminoácido en el polipéptido para producir uno o más codones ámbar en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Incorporar uno o más aminoácidos no naturales en el polipéptido a partir del cual el TID se basa o se deriva puede comprender modificar uno o más residuos de aminoácido en el polipéptido para producir uno o más codones ámbar en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse en el polipéptido en respuesta a un codón ámbar. El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse de manera específica de sitio en el polipéptido.

Incorporar uno o más aminoácidos no naturales en el polipéptido a partir del cual el CAR-ID y el TID se basan o se derivan puede comprender el uso de uno o más aminoácidos no naturales codificados genéticamente con reactividad química ortogonal en relación con los veinte aminoácidos canónicos para modificar de manera específica de sitio el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o péptido de direccionamiento. Incorporar uno o más aminoácidos no naturales puede comprender el uso de una o más ARNt sintetasas. La ARNt sintetasa puede ser una aminoacil ARNt sintetasa. La ARNt sintetasa puede ser una síntesis de ARNt mutante. Incorporar uno o más aminoácidos no naturales puede comprender un par de ARNt/ARNt sintetasa. El par de ARNt/ARNt sintetasa puede comprender un par de ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa. El par de ARNt/ARNt sintetasa puede comprender un par de ARNt^{Tyr}/tirosil-ARNt sintetasa. Incorporar el uno o más aminoácidos no naturales puede comprender el uso de un par de ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa evolucionado para incorporar de manera específica de sitio uno o más aminoácidos no naturales en sitios definidos en el polipéptido en respuesta a uno o más codones sin sentido ámbar.

Los métodos adicionales para incorporar aminoácidos no naturales incluyen, pero no se limitan a, los métodos dados a conocer en Chatterjee *et al.* (A Versatile Platform for Single- and Multiple-Unnatural Amino Acid Mutagenesis in *Escherichia coli*, *Biochemistry*, 2013), Kazane *et al.* (*J Am Chem Soc*, 135(1):340-6, 2013), Kim *et al.* (*J Am Chem Soc*, 134(24):9918-21, 2012), Johnson *et al.* (*Nat Chem Biol*, 7(11):779-86, 2011) y Hutchins *et al.* (*J Mol Biol*, 406(4):595-603, 2011).

Un método de producción de un interruptor para activar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) puede comprender (a) obtener un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural; y (b) unir un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) al TID, produciendo de ese modo el interruptor. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. El CAR-ID puede seleccionarse del grupo que consiste en DOTA, dinitrofenol, quinona, biotina, anilina, atrazina, un derivado de anilina, ácido o-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido m-aminobenzoico, hidralazina, halotano, digoxigenina, arsonato de benceno, lactosa, trinitrofenol, biotina o un derivado del mismo. El CAR-ID puede comprender isotiocianato de fluoresceína (FITC). El CAR-ID puede comprender biotina. El CAR-ID puede comprender dinitrofenol. El TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. El TID puede comprender folato o un derivado del mismo. El TID puede comprender un polipéptido basado en o derivado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD 19. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-EGFR. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD20. El anticuerpo puede ser un

anticuerpo anti-Her2. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El anticuerpo puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El interruptor puede comprender además un ligador. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede ser un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender además una o más subunidades de polietilenglicol. El ligador puede comprender al menos cuatro subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 10 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 20 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 30 subunidades de PEG. El ligador puede comprender una azida en un extremo. El ligador puede comprender un aminoóxido en un extremo. El ligador puede ser un ligador de azida-PEG-aminoóxido. El ligador puede comprender ciclooctino en un extremo. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser un 1,2,3-triazol o un 1,2,4-triazol. El ligador puede ser un ligador de NHS-éster. El ligador puede ser un ligador de TriA. El ligador puede ser un ligador de NHS-éster.

Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el CAR-ID al TID puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el CAR-ID al TID puede comprender uno o más acoplamientos de isotiocianato. Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el CAR-ID a un aminoácido de TID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más reacciones biortogonales. El CAR-ID puede unirse al TID de manera específica de sitio. El CAR-ID puede unirse a un sitio predeterminado en el TID. El CAR-ID puede unirse al TID de una manera independiente del sitio.

El método puede comprender además unir un primer ligador al TID para producir un primer producto intermedio de interruptor. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o cicloadiciones. Unir el primer ligador al TID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el primer ligador al TID puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el primer ligador al TID puede comprender ligación de oxima. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar una o más oximas entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces estables entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces covalentes entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces no covalentes entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces iónicos entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender unir el ligador a un aminoácido de TID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más reacciones biortogonales.

Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender a cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender uno o más acoplamientos de isotiocianato.

El método puede comprender además unir un segundo ligador al CAR-ID para producir un segundo producto intermedio de interruptor. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o cicloadiciones. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender ligación de oxima. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar una o más oximas entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces estables entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces covalentes entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces no covalentes entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces iónicos entre el segundo ligador y el CAR-ID.

- Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender uno o más acoplamiento de éster. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender uno o más acoplamiento de isotiocianato. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender unir el ligador a un aminoácido de CAR-ID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más reacciones biortogonales.
- Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender uno o más acoplamiento de éster. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender uno o más acoplamiento de isotiocianato.
- Un método de producción de un interruptor para activar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) puede comprender (a) poner en contacto un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) con un dominio de interacción con la diana (TID); y (b) producir el interruptor uniendo el CAR-ID a un sitio predeterminado en el TID. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. El CAR-ID puede seleccionarse del grupo que consiste en DOTA, dinitrofenol, quinona, biotina, anilina, atrazina, un derivado de anilina, ácido o-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido m-aminobenzoico, hidralazina, halotano, digoxigenina, arsonato de benceno, lactosa, trinitrofenol, biotina o un derivado de los mismos. El CAR-ID puede comprender isotiocianato de fluoresceína (FITC). El CAR-ID puede comprender biotina. El CAR-ID puede comprender dinitrofenol. El TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. El TID puede comprender folato o un derivado del mismo. El TID puede comprender un polipéptido basado en o derivado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD 19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD 19. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-EGFR. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD20. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-HER2. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El anticuerpo puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El interruptor puede comprender además un ligador. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede ser un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender además una o más subunidades de polietilenglicol. El ligador puede comprender al menos cuatro subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 10 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 20 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 30 subunidades de PEG. El ligador puede comprender una azida en un extremo. El ligador puede comprender un aminoóxilo en un extremo. El ligador puede ser un ligador de azida-PEG-aminoóxilo. El ligador puede comprender ciclooctino en un extremo. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser un 1,2,3-triazol o un 1,2,4-triazol. El ligador puede ser un ligador de NHS-éster. El ligador puede ser un ligador de TriA. El ligador puede ser un ligador de NHS-éster.
- Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el CAR-ID al TID puede comprender uno o más acoplamiento de éster. Unir el CAR-ID al TID puede comprender uno o más acoplamiento de isotiocianato. Unir el CAR-ID al TID puede comprender

unir el CAR-ID a un aminoácido de TID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más reacciones biortogonales. El CAR-ID puede unirse al TID de manera específica de sitio. El CAR-ID puede unirse a un sitio predeterminado en el TID. El CAR-ID puede unirse al TID de una manera independiente del sitio.

5 El método puede comprender además unir un primer ligador al TID para producir un primer producto intermedio de interruptor. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o cicloadiciones. Unir el primer ligador al TID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el primer ligador al TID puede comprender uno o más acoplamiento de éster. Unir el primer ligador al TID puede comprender ligación de oxima. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar una o más oximas entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces estables entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces covalentes entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces no covalentes entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces iónicos entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender unir el ligador a un aminoácido de TID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más reacciones biortogonales.

20 Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender uno o más acoplamiento de éster. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender uno o más acoplamiento de isotiocianato.

El método puede comprender además unir un segundo ligador al CAR-ID para producir un segundo producto intermedio de interruptor. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o cicloadiciones. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender uno o más acoplamiento de éster. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender ligación de oxima. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar una o más oximas entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces estables entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces covalentes entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces no covalentes entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces iónicos entre el segundo ligador y el CAR-ID.

45 Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender uno o más acoplamiento de éster. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender uno o más acoplamiento de isotiocianato. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender unir el ligador a un aminoácido de CAR-ID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más reacciones biortogonales.

60 Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el primer

producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender uno o más acoplamientos de isotiocianato.

Un método de producción de un interruptor para activar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) puede comprender (a) poner en contacto una pluralidad de dominios de interacción con receptores de antígenos quiméricos (CAR-ID) con una pluralidad de dominios de interacción con la diana (TID); y (b) unir uno o más CAR-ID de la pluralidad de CAR-ID a uno o más TID de la pluralidad de TID, produciendo de ese modo una pluralidad de interruptores, en la que al menos aproximadamente el 60% de los interruptores son estructuralmente homólogos. Al menos aproximadamente el 65%, 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97%, 99% o el 100% de los interruptores pueden ser estructuralmente homólogos. Al menos aproximadamente el 70% de los interruptores pueden ser estructuralmente homólogos. Al menos aproximadamente el 75% de los interruptores pueden ser estructuralmente homólogos. Al menos aproximadamente el 80% de los interruptores pueden ser estructuralmente homólogos. Al menos aproximadamente el 85% de los interruptores pueden ser estructuralmente homólogos. Al menos aproximadamente el 90% de los interruptores pueden ser estructuralmente homólogos. Al menos aproximadamente el 95% de los interruptores pueden ser estructuralmente homólogos. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. El CAR-ID puede seleccionarse del grupo que consiste en DOTA, dinitrofenol, quinona, biotina, anilina, atrazina, un derivado de anilina, ácido o-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido m-aminobenzoico, hidralazina, halotano, digoxigenina, arsonato de benceno, lactosa, trinitrofenol, biotina o un derivado de los mismos. El CAR-ID puede comprender isotiocianato de fluoresceína (FITC). El CAR-ID puede comprender biotina. El CAR-ID puede comprender dinitrofenol. El TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. El TID puede comprender folato o un derivado del mismo. El TID puede comprender un polipéptido basado en o derivado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD 19. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-EGFR. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD20. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-Her2. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El anticuerpo puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El interruptor puede comprender además un ligador. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede ser un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender además una o más subunidades de polietilenglicol. El ligador puede comprender al menos cuatro subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 10 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 20 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 30 subunidades de PEG. El ligador puede comprender una azida en un extremo. El ligador puede comprender un aminoóxilo en un extremo. El ligador puede ser un ligador de azida-PEG-aminoóxilo. El ligador puede comprender ciclooctino en un extremo. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser un 1,2,3-triazol o un 1,2,4-triazol. El ligador puede ser un ligador de NHS-éster. El ligador puede ser un ligador de TriA. El ligador puede ser un ligador de NHS-éster.

Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el CAR-ID al TID puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el CAR-ID al TID puede comprender uno o más acoplamientos de isotiocianato. Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el CAR-ID a un aminoácido de TID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más reacciones biortogonales. El CAR-ID puede unirse al TID de manera específica de sitio. El CAR-ID puede unirse a un sitio predeterminado en el TID. El CAR-ID puede unirse al TID de una manera independiente del sitio.

El método puede comprender además unir un primer ligador al TID para producir un primer producto intermedio de interruptor. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o cicloadiciones. Unir el primer ligador al TID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el primer ligador al TID puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el primer ligador al TID puede comprender ligación de oxima. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar una o más oximas entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces estables entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces covalentes entre el primer ligador y el TID. Unir el primer

ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces no covalentes entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces iónicos entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender unir el ligador a un aminoácido de TID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más reacciones biortogonales.

5 Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender uno o más acoplamientos de isotiocianato.

20 El método puede comprender además unir un segundo ligador al CAR-ID para producir un segundo producto intermedio de interruptor. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o cicloadiciones. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender uno o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender ligación de oxima. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar una o más oximas entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces estables entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces covalentes entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces no covalentes entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces iónicos entre el segundo ligador y el CAR-ID.

30 Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender uno o más acoplamientos de isotiocianato. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender unir el ligador a un aminoácido de CAR-ID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más reacciones biortogonales.

45 Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender uno o más acoplamientos de isotiocianato.

60 Un método de producción de un interruptor para activar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) puede comprender (a) poner en contacto una pluralidad de dominios de interacción con receptores de antígenos quiméricos (CAR-ID) con una pluralidad de dominios de interacción con la diana (TID); y (b) unir un CAR-ID de la pluralidad de CAR-ID a un TID de la pluralidad de TID, produciendo de ese modo una pluralidad de interruptores, en la que el CAR-ID se une al mismo residuo de aminoácido del TID en al menos aproximadamente el 60% de los interruptores. El CAR-ID puede unirse al mismo residuo de aminoácido del TID en al menos aproximadamente el 62%, 65%, 67%, 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97%, 99% o el 100% de los interruptores.

El CAR-ID puede unirse al mismo residuo de aminoácido del TID en al menos aproximadamente el 70% de los interruptores. El CAR-ID puede unirse al mismo residuo de aminoácido del TID en al menos aproximadamente el 75% de los interruptores. El CAR-ID puede unirse al mismo residuo de aminoácido del TID en al menos aproximadamente el 80% de los interruptores. El CAR-ID puede unirse al mismo residuo de aminoácido del TID en al menos aproximadamente el 85% de los interruptores. El CAR-ID puede unirse al mismo residuo de aminoácido del TID en al menos aproximadamente el 90% de los interruptores.

El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. El CAR-ID puede seleccionarse del grupo que consiste en DOTA, dinitrofenol, quinona, biotina, anilina, atrazina, un derivado de anilina, ácido o-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido m-aminobenzoico, hidralazina, halotano, digoxigenina, arsonato de benceno, lactosa, trinitrofenol, biotina o un derivado de los mismos. El CAR-ID puede comprender isotiocianato de fluoresceína (FITC). El CAR-ID puede comprender biotina. El CAR-ID puede comprender dinitrofenol. El TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. El TID puede comprender folato o un derivado del mismo. El TID puede comprender un polipéptido basado en o derivado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD 19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD 19. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-EGFR. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD20. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-Her2. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El anticuerpo puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El interruptor puede comprender además un ligador. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede ser un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender además una o más subunidades de polietilenglicol. El ligador puede comprender al menos cuatro subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 10 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 20 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 30 subunidades de PEG. El ligador puede comprender una azida en un extremo. El ligador puede ser un ligador de azida-PEG-aminooxilo. El ligador puede comprender ciclooctino en un extremo. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser un 1,2,3-triazol o un 1,2,4-triazol. El ligador puede ser un ligador de NHS-éster. El ligador puede ser un ligador de TriA. El ligador puede ser un ligador de NHS-éster.

Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de cobre. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el CAR-ID al TID puede comprender uno o más acoplamiento de éster. Unir el CAR-ID al TID puede comprender uno o más acoplamiento de isotiocianato. Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el CAR-ID a un aminoácido de TID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más reacciones biortogonales. El CAR-ID puede unirse al TID de manera específica de sitio. El CAR-ID puede unirse a un sitio predeterminado en el TID. El CAR-ID puede unirse al TID de una manera independiente del sitio.

El método puede comprender además unir un primer ligador al TID para producir un primer producto intermedio de interruptor. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o cicloadiciones. Unir el primer ligador al TID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el primer ligador al TID puede comprender uno o más acoplamiento de éster. Unir el primer ligador al TID puede comprender ligación de oxima. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar una o más oximas entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces estables entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces covalentes entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces iónicos entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender unir el ligador a un aminoácido de TID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más reacciones biortogonales.

Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender

una o más reacciones que contienen cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender uno o más acoplamientos de isotiocianato.

El método puede comprender además unir un segundo ligador al CAR-ID para producir un segundo producto intermedio de interruptor. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o cicloadición. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender ligación de oxima. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar una o más oximas entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces estables entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces covalentes entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces no covalentes entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces iónicos entre el segundo ligador y el CAR-ID.

Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o cicloadición. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender uno o más acoplamientos de isotiocianato. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender unir el ligador a un aminoácido de CAR-ID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más reacciones biortogonales.

Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o cicloadición. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender uno o más acoplamientos de isotiocianato.

Un método de producción de un interruptor para activar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) puede comprender (a) poner en contacto un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) con un dominio de interacción con la diana (TID); y (b) unir el CAR-ID al TID mediante conjugación de oxima, cicloadición de Huisgen o reacción de Diels Alder, produciendo de ese modo el interruptor. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. El CAR-ID puede seleccionarse del grupo que consiste en DOTA, dinitrofenol, quinona, biotina, anilina, atrazina, un derivado de anilina, ácido o-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido m-aminobenzoico, hidralazina, halotano, digoxigenina, arsonato de benceno, lactosa, trinitrofenol, biotina o un derivado de los mismos. El CAR-ID puede comprender isotiocianato de fluoresceína (FITC). El CAR-ID puede comprender biotina. El CAR-ID puede comprender dinitrofenol. El TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. El TID puede comprender folato o un derivado del mismo. El TID puede comprender un polipéptido basado en o derivado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD 19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD 19. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-EGFR. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD20. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-HER2. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El anticuerpo puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de una

5 cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El interruptor puede comprender además un ligador. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede ser un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender además una o más subunidades de polietilenglicol. El ligador puede comprender al menos cuatro subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 10 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 20 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 30 subunidades de PEG. El ligador puede comprender una azida en un extremo. El ligador puede comprender un aminooxilo en un extremo. El ligador puede ser un ligador de azida-PEG-aminooxilo. El ligador puede comprender ciclooctino en un extremo. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser un 1,2,3-triazol o un 1,2,4-triazol. El ligador puede ser un ligador de NHS-éster. El ligador puede ser un ligador de TriA. El ligador puede ser un ligador de NHS-éster.

15 Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el CAR-ID al TID puede comprender uno o más acoplamiento de éster. Unir el CAR-ID al TID puede comprender uno o más acoplamiento de isotiocianato. Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el CAR-ID a un aminoácido de TID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más reacciones bioortogonales. El CAR-ID puede unirse al TID de manera específica de sitio. El CAR-ID puede unirse a un sitio predeterminado en el TID. El CAR-ID puede unirse al TID de una manera independiente del sitio.

25 El método puede comprender además unir un primer ligador al TID para producir un primer producto intermedio de interruptor. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o cicloadiciones. Unir el primer ligador al TID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el primer ligador al TID puede comprender uno o más acoplamiento de éster. Unir el primer ligador al TID puede comprender ligación de oxima. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar una o más oximas entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces estables entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces covalentes entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces no covalentes entre el primer ligador y el TID. Unir el primer ligador al TID puede comprender unir el ligador a un aminoácido de TID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el primer ligador al TID puede comprender una o más reacciones biortogonales.

40 Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender uno o más acoplamiento de éster. Unir el primer producto intermedio de interruptor al CAR-ID puede comprender uno o más acoplamiento de isotiocianato.

55 El método puede comprender además unir un segundo ligador al CAR-ID para producir un segundo producto intermedio de interruptor. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o cicloadiciones. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender uno o más acoplamiento de éster. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender ligación de oxima. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar una o más oximas entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces estables entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces covalentes entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces no covalentes entre el segundo ligador y el CAR-ID. Unir el segundo ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces iónicos entre el segundo ligador y el CAR-ID.

65 Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden

comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender uno o más acoplamientos de isotiocianato. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender unir el ligador a un aminoácido de CAR-ID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el segundo producto intermedio de interruptor al TID puede comprender una o más reacciones biortogonales.

Unir el CAR-ID al TID puede comprender unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender uno o más acoplamientos de isotiocianato.

Un método de producción de un producto intermedio de interruptor para activar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) puede comprender (b) poner en contacto un dominio de interacción con la diana (TID) con un ligador, comprendiendo el ligador un grupo aminoóxido, grupo azida y/o grupo ciclooctino en uno o más extremos terminales; y (c) unir el ligador al TID. El TID puede comprender un polipéptido basado en o derivado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD 19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD 19. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-EGFR. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD20. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-HER2. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El anticuerpo puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. Unir el ligador al TID puede comprender formar una oxima. La oxima puede formarse entre una cetona de un aminoácido en el TID y el grupo aminoóxido en el ligador. La oxima puede formarse entre un grupo alcoxi-amina del ligador y una cetona del aminoácido no natural. La oxima puede formarse entre un grupo alcoxi-amina del ligador y una cetona del aminoácido no natural, en el que el aminoácido no natural es p-acetilfenilalanina (pAcF). El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede ser un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender un grupo aminoóxido, grupo azida, grupo ciclooctino, o una combinación de los mismos en uno o más extremos terminales. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol. El ligador puede comprender al menos cuatro subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 10 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 20 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 30 subunidades de PEG. El ligador puede comprender una azida en un extremo. El ligador puede comprender un aminoóxido en un extremo. El ligador puede ser un ligador de azida-PEG-aminoóxido. El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser un 1,2,3-triazol o un 1,2,4-triazol. El ligador puede ser un ligador de NHS-éster. El ligador puede ser un ligador de TriA. El ligador puede ser un ligador de NHS-éster.

Unir el ligador al TID puede comprender una o cicloadiciones. Unir el ligador al TID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el ligador al TID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el ligador al TID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el ligador al TID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el ligador al TID puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el ligador al TID puede comprender ligación de oxima. Unir el ligador al TID puede comprender formar una o más oximas entre el ligador y el TID. Unir el ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces estables entre el ligador y el TID. Unir el ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces covalentes entre el ligador y el TID. Unir el ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces no covalentes entre el ligador y el TID. Unir el ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces iónicos entre el ligador y el TID. Unir el ligador al TID puede comprender unir el ligador a un aminoácido de TID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el ligador al TID puede comprender una o más reacciones biortogonales.

Un método de producción de un producto intermedio de interruptor para activar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) puede comprender (a) poner en contacto un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) con un ligador, comprendiendo el ligador un grupo aminoóxilo, grupo azida y/o grupo ciclooctino en uno o más extremos terminales; y (b) unir el ligador al CAR-ID. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. El CAR-ID puede seleccionarse del grupo que consiste en DOTA, dinitrofenol, quinona, biotina, anilina, atrazina, un derivado de anilina, ácido o-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido m-aminobenzoico, hidralazina, halotano, digoxigenina, arsonato de benceno, lactosa, trinitrofenol, biotina o un derivado de los mismos. El CAR-ID puede comprender isotiocianato de fluoresceína (FITC). El CAR-ID puede comprender biotina. El CAR-ID puede comprender dinitrofenol. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede ser un ligador homobifuncional. El ligador puede comprender además una o más subunidades de polietilenglicol. El ligador puede comprender al menos cuatro subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 10 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 20 subunidades de PEG. El ligador puede comprender al menos 30 subunidades de PEG. El ligador puede comprender una azida en un extremo. El ligador puede comprender un aminoóxilo en un extremo. El ligador puede ser un ligador de azida-PEG-aminoóxilo. El ligador puede comprender ciclooctino en un extremo. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede unirse al CAR-ID mediante ligación de oxima.

Unir el ligador al CAR-ID puede comprender una o más cicloadiciones. Unir el ligador al CAR-ID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el ligador al CAR-ID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el ligador al CAR-ID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el ligador al CAR-ID puede comprender uno o más acoplamiento de éster. Unir el ligador al CAR-ID puede comprender ligación de oxima. Unir el ligador al CAR-ID puede comprender formar una o más oximas entre el ligador y el CAR-ID. Unir el ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces estables entre el ligador y el CAR-ID. Unir el ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces covalentes entre el ligador y el CAR-ID. Unir el ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces no covalentes entre el ligador y el CAR-ID. Unir el ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces iónicos entre el ligador y el CAR-ID. Unir el ligador al CAR-ID puede comprender unir el ligador a un aminoácido de CAR-ID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el ligador al CAR-ID puede comprender una o más reacciones biortogonales.

Un método de producción de un interruptor de fórmula IV: X-L1-L2-Y o fórmula IVA: Y-L2-L1-X puede comprender (a) acoplar L1 a X para producir un primer producto intermedio de interruptor de fórmula IIA: L1-X, en la que (i) X comprende un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en una célula efectora; y (ii) L1 comprende un primer ligador antes de acoplarse a X; (b) acoplar L2 a Y para producir un segundo producto intermedio de interruptor de fórmula VA: Y-L2, en la que (i) Y comprende un dominio de interacción con la diana (TID) que interacciona con una molécula de superficie en una célula diana; y (ii) L2 comprende un segundo ligador antes de acoplarse a X; y (c) unir el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor, produciendo de ese modo el interruptor de fórmula IV o IVA. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. El CAR-ID puede seleccionarse del grupo que consiste en DOTA, dinitrofenol, quinona, biotina, anilina, atrazina, un derivado de anilina, ácido o-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido m-aminobenzoico, hidralazina, halotano, digoxigenina, arsonato de benceno, lactosa, trinitrofenol, biotina o un derivado de los mismos. El CAR-ID puede comprender isotiocianato de fluoresceína (FITC). El CAR-ID puede comprender biotina. El CAR-ID puede comprender dinitrofenol.

El primer ligador puede ser un ligador bifuncional. El primer ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El primer ligador puede ser un ligador homobifuncional. El primer ligador puede comprender además una o más subunidades de polietilenglicol. El primer ligador puede comprender al menos cuatro subunidades de PEG. El primer ligador puede comprender al menos 10 subunidades de PEG. El primer ligador puede comprender al menos 20 subunidades de PEG. El primer ligador puede comprender al menos 30 subunidades de PEG. El primer ligador puede comprender una azida en un extremo. El primer ligador puede comprender un aminoóxilo en un extremo. El primer ligador puede ser un ligador de azida-PEG-aminoóxilo. El primer ligador puede comprender ciclooctino en un extremo. El primer ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino.

El TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. El TID puede comprender folato o un derivado del mismo. El TID puede comprender un polipéptido basado en o derivado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD 19. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-EGFR. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD20. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-HER2. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El anticuerpo puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56.

- El segundo ligador puede ser un ligador bifuncional. El segundo ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El segundo ligador puede ser un ligador homobifuncional. El segundo ligador puede comprender además una o más subunidades de polietilenglicol. El segundo ligador puede comprender al menos cuatro subunidades de PEG. El segundo ligador puede comprender al menos 10 subunidades de PEG. El segundo ligador puede comprender al menos 20 subunidades de PEG. El segundo ligador puede comprender al menos 30 subunidades de PEG. El segundo ligador puede comprender una azida en un extremo. El segundo ligador puede comprender un aminoóxido en un extremo. El segundo ligador puede ser un ligador de azida-PEG-aminoóxido. El segundo ligador puede comprender un ciclooctino en un extremo. El segundo ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino.
- El método puede comprender además incorporar uno o más aminoácidos no naturales en X. Acoplar L1 a X puede comprender unir L1 a un aminoácido no natural en X. Acoplar L1 a X puede comprender unión específica de sitio. Acoplar L1 a X puede comprender unir L1 a X en un sitio predeterminado. Acoplar L1 a X puede comprender ligación de oxima. Acoplar L1 a X puede comprender acoplamiento de éster.
- El método puede comprender además incorporar uno o más aminoácidos no naturales en Y. Acoplar L2 a Y puede comprender unir L2 a un aminoácido no natural en Y. Acoplar L2 a Y puede comprender unión específica de sitio. Acoplar L2 a Y puede comprender unir L2 a Y en un sitio predeterminado. Acoplar L2 a Y puede comprender ligación de oxima. Acoplar L2 a Y puede comprender acoplamiento de éster.
- Acoplar el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o cicloadiciones. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición de Huisgen [3+2]. La una o más cicloadiciones pueden comprender una cicloadición libre de cobre. Acoplar el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una reacción libre de cobre. Acoplar el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el CAR-ID al TID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Acoplar el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Acoplar el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Acoplar el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender uno o más acoplamientos de isotiocianato. Acoplar el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender unir el CAR-ID a un aminoácido de TID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Acoplar el primer producto intermedio de interruptor al segundo producto intermedio de interruptor puede comprender una o más reacciones biortogonales. El primer producto intermedio de interruptor puede unirse al segundo producto intermedio de interruptor de manera específica de sitio. El primer producto intermedio de interruptor puede unirse a un sitio predeterminado en el segundo producto intermedio de interruptor. El primer producto intermedio de interruptor puede unirse al segundo producto intermedio de interruptor de una manera independiente del sitio.
- Unir el primer ligador al CAR-ID puede comprender una o cicloadiciones. Unir el primer ligador al CAR-ID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el primer ligador al CAR-ID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el primer ligador al CAR-ID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el primer ligador al CAR-ID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el primer ligador al CAR-ID puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el primer ligador al CAR-ID puede comprender ligación de oxima. Unir el primer ligador al CAR-ID puede comprender formar una o más oximas entre el primer ligador y el CAR-ID. Unir el primer ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces estables entre el primer ligador y el CAR-ID. Unir el primer ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces covalentes entre el primer ligador y el CAR-ID. Unir el primer ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces no covalentes entre el primer ligador y el CAR-ID. Unir el primer ligador al CAR-ID puede comprender formar uno o más enlaces iónicos entre el primer ligador y el CAR-ID. Unir el primer ligador al CAR-ID puede comprender unir el ligador a un aminoácido de CAR-ID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el primer ligador al CAR-ID puede comprender una o más reacciones biortogonales.
- Unir el segundo ligador al TID puede comprender una o cicloadiciones. Unir el segundo ligador al TID puede comprender una reacción libre de cobre. Unir el segundo ligador al TID puede comprender una o más reacciones que contienen cobre. Unir el segundo ligador al TID puede comprender una o más reacciones de Diels Alder. Unir el segundo ligador al TID puede comprender una o más heterorreacciones de Diels Alder. Unir el segundo ligador al TID puede comprender uno o más acoplamientos de éster. Unir el segundo ligador al TID puede comprender ligación de oxima. Unir el segundo ligador al TID puede comprender formar una o más oximas entre el segundo ligador y el TID. Unir el segundo ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces estables entre el segundo ligador y el TID. Unir el segundo ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces covalentes entre el segundo ligador y el TID. Unir el segundo ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces no covalentes entre el segundo ligador y el TID. Unir el segundo ligador al TID puede comprender formar uno o más enlaces iónicos entre el segundo ligador y el TID. Unir el segundo ligador al TID puede comprender unir el ligador a un aminoácido de TID. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural. Unir el segundo ligador al TID puede comprender una o más reacciones biortogonales.

El método de producción de los interruptores dados a conocer en el presente documento puede comprender además purificar los interruptores. El método puede comprender además purificar el TID, CAR-ID, ligador, o cualquier combinación de los mismos. Los métodos pueden comprender además purificar uno o más productos intermedios de interruptores. El TID puede comprender un polipéptido. El polipéptido puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El producto intermedio de interruptor puede comprender un TID y un ligador. Purificar el interruptor y producto intermedio de interruptor puede comprender eliminar ligadores en exceso, TID en exceso y CAR-ID en exceso. Los ligadores, TID y CAR-ID en exceso pueden eliminarse simultáneamente. Los ligadores, TID y CAR-ID en exceso pueden eliminarse secuencialmente. La eliminación de los polipéptidos que comprenden TID y CAR-ID puede comprender tratar una disolución que comprende el interruptor, producto intermedio de interruptor, ligadores, CAR-ID, y/o TID con una o más proteasas. Purificar el interruptor, producto intermedio de interruptor, ligadores, CAR-ID y/o TID puede comprender purificación en columna. Purificar el interruptor, producto intermedio de interruptor, ligadores, CAR-ID y/o TID puede comprender el uso de una o más columnas concentradoras, electroforesis, filtración, centrifugación, cromatografía o una combinación de las mismas. La cromatografía puede comprender cromatografía de exclusión molecular. Métodos de cromatografía adicionales incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, unión a metal, cromatografía de inmunoafinidad y cromatografía de líquidos de alta resolución o cromatografía de líquidos de alta presión. La electroforesis puede comprender electroforesis desnaturalizante o electroforesis no desnaturalizante.

El interruptor, producto intermedio de interruptor, ligadores, CAR-ID y/o TID pueden comprender una o más etiquetas de purificación o moléculas de purificación. Los ligadores pueden comprender una o más etiquetas. Las etiquetas pueden usarse para purificar el interruptor, producto intermedio de interruptor, ligadores, CAR-ID y/o TID. Los ejemplos de etiquetas incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, etiqueta FLAG®, HA, c-myc, V5, proteína de unión a quitina (CBP), proteína de unión a maltosa (MBP) y glutatión-S-transferasa (GST). La etiqueta puede ser una etiqueta no peptídica. La etiqueta puede ser biotina. La una o más etiquetas pueden escindirse mediante una o más proteasas.

Los métodos pueden comprender además liofilización o ultracentrifugación de los CAR-BP, CAR-ID, CAR-ID, TC, TID y productos intermedios de los mismos.

La pureza del interruptor, producto intermedio de interruptor, ligadores, CAR-ID y/o TID puede ser igual o mayor del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más. La pureza del interruptor, producto intermedio de interruptor, ligadores, CAR-ID y/o TID puede ser igual o mayor del 85%. La pureza del interruptor, producto intermedio de interruptor, ligadores, CAR-ID y/o TID puede ser igual o mayor del 90%. La pureza del interruptor, producto intermedio de interruptor, ligadores, CAR-ID y/o TID puede ser igual o mayor del 95%. La pureza de los CAR-BP, CAR-ID, CAR-ID, TC, TID y productos intermedios de los mismos puede ser igual o mayor del 97%.

La homogeneidad de los interruptores o productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento puede ser igual o mayor del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más. La homogeneidad de los interruptores o productos intermedios de interruptores puede ser igual o mayor del 85%. La homogeneidad de los interruptores o productos intermedios de interruptores puede ser igual o mayor del 90%. La homogeneidad de los interruptores o productos intermedios de interruptores puede ser igual o mayor del 95%. La homogeneidad de los interruptores o productos intermedios de interruptores puede ser igual o mayor del 97%. La homogeneidad puede referirse a homogeneidad estructural. La homogeneidad puede ser una homogeneidad estructural antes de la administración de la célula a un sujeto. La homogeneidad puede ser una homogeneidad estructural antes de las modificaciones en el interruptor de CAR-EC mediante actividades celulares (metilación, acetilación, glicosilación, etc.). Estos altos porcentajes de homogeneidad pueden proporcionar un efecto más predecible del interruptor de CAR-EC. Estos altos porcentajes de homogeneidad pueden proporcionar menos efectos fuera de diana del interruptor de CAR-EC, cuando se combina con una CAR-EC para tratar un estado en un sujeto.

Los métodos de producción de interruptores de CAR-EC dados a conocer en el presente documento pueden comprender producir una pluralidad de interruptores con una pureza igual o mayor del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más. La pureza de la pluralidad de interruptores puede ser igual o mayor del 85%. La pureza de la pluralidad de interruptores puede ser igual o mayor del 90%. La pluralidad de interruptores puede ser igual o mayor del 95%. La pureza de la pluralidad de interruptores puede ser igual o mayor del 97%. La pureza puede evaluarse mediante métodos conocidos en la técnica (por ejemplo color, contenido en agua, contenido en pirógenos, contenido en impurezas, etc.). La pureza de una pluralidad de interruptores de CAR-EC que comprenden un CAR-ID que comprende FITC y un TID que comprende un polipéptido producido por conjugación de oxima, cicloadición de Huisgen o reacción de Diels Alder puede ser mayor del 70%, 75%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97% o el 99%. La pureza de una pluralidad de interruptores de CAR-EC que comprenden un CAR-ID que comprende FITC y un TID que comprende un polipéptido producido por conjugación de oxima, cicloadición de Huisgen o reacción de Diels Alder puede ser mayor del 85%. La pureza de una pluralidad de interruptores de CAR-EC que comprenden un CAR-ID que comprende FITC y un TID que comprende un polipéptido producido por conjugación de oxima, cicloadición de Huisgen o reacción de Diels Alder puede ser mayor del 90%. La pureza de una pluralidad de interruptores de CAR-EC que comprenden un CAR-ID que comprende FITC y un TID que

comprende un polipéptido producido por conjugación de oxima, cicloadición de Huisgen o reacción de Diels Alder puede ser mayor del 95%. La pureza de una pluralidad de interruptores que comprenden un CAR-ID que comprende FITC y un TID que comprende una molécula pequeña producida mediante síntesis química puede ser una pureza mayor del 70%, 75%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97% o el 99%. La pureza de una pluralidad de interruptores que comprenden un CAR-ID que comprende FITC y un TID que comprende una molécula pequeña producida mediante síntesis química puede ser una pureza mayor del 80%. La pureza de una pluralidad de interruptores que comprenden un CAR-ID que comprende FITC y un TID que comprende una molécula pequeña producida mediante síntesis química puede ser una pureza mayor del 85%. La pureza de una pluralidad de interruptores que comprenden un CAR-ID que comprende FITC y un TID que comprende una molécula pequeña producida mediante síntesis química puede ser una pureza mayor del 90%. La pureza de una pluralidad de interruptores que comprenden un CAR-ID que comprende FITC y un TID que comprende una molécula pequeña producida mediante síntesis química puede ser una pureza mayor del 95%. La pureza de una pluralidad de interruptores que comprenden un CAR-ID que comprende FITC y un TID que comprende una molécula pequeña producida mediante síntesis química puede ser una pureza mayor del 98%.

Células efectoras con receptores de antígenos quiméricos (CAR-EC)

Los métodos, las plataformas y los kits dados a conocer en el presente documento pueden comprender una o más células efectoras con receptores de antígenos quiméricos (CAR-EC) o usos de las mismas. Los métodos, las plataformas o los kits comprenden dos o más CAR-EC o usos de las mismas. Los métodos, las plataformas o los kits pueden comprender una pluralidad de CAR-EC o usos de las mismas. Al menos dos de la pluralidad de CAR-EC puede ser del mismo tipo de célula. Al menos dos de la pluralidad de CAR-EC pueden ser del mismo linaje celular. Al menos dos de la pluralidad de CAR-EC pueden ser de un tipo celular diferente. Al menos dos de la pluralidad de CAR-EC pueden ser de linajes celulares diferentes. Al menos dos de la pluralidad de CAR-EC pueden comprender CAR idénticos. Al menos dos de la pluralidad de CAR-EC pueden comprender dos o más CAR diferentes. Al menos dos de la pluralidad de CAR-EC pueden comprender dos o más CAR similares.

Una CAR-EC puede comprender una célula efectora que expresa un CAR. La célula efectora puede ser una célula T. La célula efectora puede ser una célula de un linaje de células T. La célula efectora puede ser una célula T madura. La célula efectora puede ser una célula T precursora. La célula efectora puede ser una célula T citotóxica. La célula efectora puede ser una célula T sin tratamiento previo. La célula efectora puede ser una célula T de célula madre de memoria (T_{MSC}). La célula efectora puede ser una célula T de memoria central (T_{CM}). La célula efectora puede ser una célula T efectora (TE). La célula efectora puede ser una célula T CD4+. La célula T puede ser una célula T CD8+. La célula efectora puede ser una célula CD4+ y CD8+. La célula efectora puede ser una célula T $\alpha\beta$. La célula efectora puede ser una célula T $\gamma\delta$. La célula efectora puede ser una célula T citolítica natural. La célula efectora puede ser una célula T auxiliar. La célula T puede sobreexpresar FoxP3.

La célula efectora puede ser una célula efectora que tiene un efecto sobre una diana o célula diana cuando se pone en proximidad a la diana o célula diana. La célula efectora puede ser una célula que tiene un efecto citotóxico sobre una diana o célula diana cuando se pone en proximidad de la diana o célula diana. La célula efectora puede ser una célula inmunitaria. La célula efectora puede seleccionarse de una célula B, un monocito, un trombocito, un leucocito, un neutrófilo, un eosinófilo, un basófilo, un macrófago o un linfocito. La célula efectora puede ser un linfocito. La célula efectora puede ser un macrófago. La célula efectora puede ser una célula fagocítica. La célula efectora puede ser una célula B efectora. La célula efectora puede ser una célula citolítica natural. La célula efectora puede ser una célula derivada de un sujeto que va a tratarse con un interruptor de CAR-EC o producto intermedio de interruptor dado a conocer en el presente documento.

La CAR-EC puede comprender uno o más polinucleótidos seleccionados de SEQ ID NO: 1-4. La CAR-EC puede comprender un polinucleótido que es al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o el 95% idéntico a uno o más polinucleótidos seleccionados de SEQ ID NO: 1-4. La CAR-EC puede comprender un polinucleótido que es al menos aproximadamente el 70% idéntico a uno o más polinucleótidos seleccionados de SEQ ID NO: 1-4. La CAR-EC puede expresar un polipéptido codificado por uno o más polinucleótidos seleccionados de SEQ ID NO: 1-4. La CAR-EC puede expresar un polipéptido codificado por un polinucleótido que es al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o el 95% idéntico a uno o más polinucleótidos seleccionados de SEQ ID NO: 1-4. El polinucleótido puede expresarse de manera constitutiva. El polinucleótido puede expresarse de manera condicional. Por ejemplo, con el fin de activar la expresión del polinucleótido en la CAR-EC, se administra un fármaco a la CAR-EC. Alternativamente, con el fin de terminar la expresión del polinucleótido en la CAR-EC, se administra un fármaco a la CAR-EC.

Se dan a conocer en el presente documento métodos de producción de una o más CAR-EC. El método puede comprender (a) infectar una célula efectora con uno o más virus que comprenden uno o más polinucleótidos seleccionados de SEQ ID NO: 1-4; y (b) cultivar la célula efectora en medios de cultivo, produciendo de ese modo la CAR-EC. El método puede comprender además administrar uno o más reactivos a los medios de cultivo para estimular la expresión de los polinucleótidos. El método puede comprender además administrar uno o más reactivos a los medios de cultivo para enriquecer la CAR-EC. Por ejemplo, el polinucleótido puede comprender además un marcador de

fármaco seleccionable que puede usarse para enriquecer células efectoras que se han infectado con el virus. El método puede comprender además purificar las CAR-EC. Purificar las CAR-EC puede comprender usar un clasificador celular. Por ejemplo, el polinucleótido puede comprender además un marcador detectable (por ejemplo, una proteína fluorescente) que puede usarse para purificar las células efectoras que se han infectado con el virus. Purificar las CAR-EC puede comprender una selección positiva. Por ejemplo, una mezcla que comprende las células efectoras y las CAR-EC puede hacerse pasar a través de una columna que comprende una molécula que puede interactuar con el CAR de las CAR-EC. Por tanto, pueden unirse a la columna y las células efectoras que no se han infectado satisfactoriamente se liberan en el eluato. La columna puede lavarse varias veces. Las CAR-EC pueden eluirse de la columna. Purificar las CAR-EC puede comprender selección negativa. Por ejemplo, la expresión del CAR en células efectoras infectadas puede dar como resultado la regulación por disminución de una molécula de superficie. Una mezcla que comprende las células efectoras y las CAR-EC puede hacerse pasar a través de una columna que comprende una molécula que puede interactuar con la molécula de superficie regulada por disminución. Por tanto, las células efectoras que no se han infectado pueden unirse a la columna y las células efectoras que expresan el CAR se liberan en el eluato. El virus puede ser un lentivirus. El virus puede ser un adenovirus. El virus puede ser un retrovirus. El virus puede ser un virus adenoasociado. El virus puede ser un virus adenoasociado autocomplementario (VAAsc). El virus puede ser un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) modificado. El virus puede ser un virus del herpes simple (VHS) modificado.

El método de producción de una CAR-EC puede comprender (a) transfectar una célula efectora con uno o más vectores que comprenden uno o más polinucleótidos seleccionados de SEQ ID NO: 1-4; y (b) cultivar la célula efectora en medios de cultivo, produciendo de ese modo la CAR-EC. El método puede comprender además administrar uno o más reactivos a los medios de cultivo para estimular la expresión de los polinucleótidos. El método puede comprender además administrar uno o más reactivos a los medios de cultivo para enriquecer la CAR-EC. Por ejemplo, el polinucleótido puede comprender además un marcador de fármaco seleccionable que puede usarse para enriquecer células efectoras que se han transfectado. El método puede comprender además purificar las CAR-EC. Purificar las CAR-EC puede comprender usar un clasificador celular. Por ejemplo, el polinucleótido puede comprender además un marcador detectable (por ejemplo, una proteína fluorescente) que puede usarse para purificar las células efectoras que se han transfectado. Purificar las CAR-EC puede comprender selección positiva. Por ejemplo, una mezcla que comprende las células efectoras y las CAR-EC puede hacerse pasar a través de una columna que comprende una molécula que puede interactuar con el CAR de las CAR-EC. Por tanto, las CAR-EC pueden unirse a la columna y las células efectoras que no se han transfectado satisfactoriamente se liberan en el eluato. La columna puede lavarse varias veces. Las CAR-EC pueden eluirse de la columna. Purificar las CAR-EC puede comprender selección negativa. Por ejemplo, expresión del CAR en células efectoras transfectadas puede dar como resultado la regulación por disminución de una molécula de superficie. Una mezcla que comprende las células efectoras y las CAR-EC puede hacerse pasar a través de una columna que comprende una molécula que puede interactuar con la molécula de superficie regulada por disminución. Por tanto, las células efectoras que no se han transfectado pueden unirse a la columna y las células efectoras que expresan el CAR se liberan en el eluato.

Receptor de antígeno quimérico (CAR)

Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden interactuar con un receptor de antígeno quimérico (CAR) en una CAR-EC, regulando de ese modo las actividades de la CAR-EC. Generalmente, la interacción del CAR-ID con el CAR puede dar como resultado la activación de una respuesta inmunitaria por la célula. El CAR puede comprender un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. El dominio extracelular puede interactuar con el CAR-ID del interruptor de CAR-EC. El dominio extracelular puede comprender al menos una porción de un anticuerpo. En algunos casos, el anticuerpo no es un anticuerpo de longitud completa. El dominio extracelular puede comprender al menos una porción de una inmunoglobulina o fragmento de la misma. La inmunoglobulina o fragmento de la misma puede seleccionarse de un grupo que comprende IgA1, IgA2, IgD, IgM, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, scFv, di-scFv, bi-scFv y Fab, Fc, F(ab')₂, pFc', un nanocuerpo, un anticuerpo, un DARPin, un diacuerpo, un camélido, un receptor de células T modificado por ingeniería genética o un monocuerpo. La inmunoglobulina puede comprender IgG4.

El anticuerpo puede tener una afinidad de unión de aproximadamente 0,01 pM, aproximadamente 0,02 pM, aproximadamente 0,03 pM, aproximadamente 0,04 pM, 0,05 pM, aproximadamente 0,06 pM, aproximadamente 0,07 pM, aproximadamente 0,08 pM, aproximadamente 0,09 pM, aproximadamente 0,1 pM, aproximadamente 0,2 pM, 0,3 pM, aproximadamente 0,4 pM, aproximadamente 0,5 pM, aproximadamente 0,6 pM, aproximadamente 0,7 pM, aproximadamente 0,8 pM, aproximadamente 0,9 pM o aproximadamente 1 pM, aproximadamente 2 pM, aproximadamente 3 pM, aproximadamente 4 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 6 pM, aproximadamente 7 pM, aproximadamente 8 pM, aproximadamente 9 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 0,01 nM, aproximadamente 0,02 nM, aproximadamente 0,03 nM, aproximadamente 0,04 nM, aproximadamente 0,05 nM, aproximadamente 0,06 nM, aproximadamente 0,07 nM, aproximadamente 0,08 nM, aproximadamente 0,09 nM, aproximadamente 0,1 nM, aproximadamente 0,2 nM, aproximadamente 0,3 nM, aproximadamente 0,4 nM, aproximadamente 0,5 nM, aproximadamente 0,6 nM, aproximadamente 0,7 nM, aproximadamente 0,8 nM, aproximadamente 0,9 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 6 nM, aproximadamente 7 nM, aproximadamente 8 nM, aproximadamente 9 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 12nM, aproximadamente 14 nM,

aproximadamente 16 nM, aproximadamente 18 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 22 nM, aproximadamente 24 nM, aproximadamente 26 nM, aproximadamente 28 nM o aproximadamente 30 nM. El dominio extracelular puede comprender al menos una porción de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). El dominio extracelular puede comprender avidina o un fragmento de la misma. El dominio extracelular puede no comprender avidina o fragmento de la misma. El anticuerpo puede comprender un anticuerpo anti-FITC o fragmento del mismo. El anticuerpo anti-FITC puede ser un scFv anti-FITC. El scFv anti-FITC puede seleccionarse de 4-4-20, 4D5Flu, 4M5.3 y FITC-E2. El scFv anti-FITC puede estar codificado por una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-4.

El anticuerpo frente a FITC o fragmento del mismo puede tener una afinidad de unión por FITC menor de 0,1 pM. El anticuerpo frente a FITC o fragmento del mismo puede tener una afinidad de unión por FITC de entre aproximadamente 0,1 pM y aproximadamente 1 pM. El anticuerpo frente a FITC o fragmento del mismo puede tener una afinidad de unión por FITC de entre aproximadamente 1 pM y aproximadamente 10 pM. El anticuerpo frente a FITC o fragmento del mismo puede tener una afinidad de unión por FITC de aproximadamente 10 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 90 pM o aproximadamente 100 pM. El anticuerpo frente a FITC o fragmento del mismo puede tener una afinidad de unión por FITC de aproximadamente 100 pM, aproximadamente 200 pM, aproximadamente 300 pM, aproximadamente 400 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 600 pM, aproximadamente 700 pM, aproximadamente 800 pM, aproximadamente 900 pM o aproximadamente 1 nM. El anticuerpo frente a FITC o fragmento del mismo puede tener una afinidad de unión por FITC de aproximadamente 1 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 6 nM, aproximadamente 7 nM, aproximadamente 8 nM, aproximadamente 9 nM o aproximadamente 10 nM. El anticuerpo frente a FITC o fragmento del mismo puede tener una afinidad de unión por FITC de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 15 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 30 nM, aproximadamente 35 nM, aproximadamente 40 nM, aproximadamente 45 nM o aproximadamente 50 nM. El anticuerpo frente a FITC o fragmento del mismo puede tener una afinidad de unión por FITC mayor de 50 nM. El anticuerpo frente a FITC puede comprender un scFv anti-FITC o fragmento del mismo. El scFv anti-FITC puede seleccionarse de un grupo que comprende 4-4-20, 4D5Flu, 4M5.3 y FITC-E2. La afinidad de unión de 4-4-20 puede ser de aproximadamente 0,2 nM. La afinidad de unión de 4D5Flu puede ser de aproximadamente 20 nM. La afinidad de unión de 4M5.3 puede ser de aproximadamente 0,3 pM. La afinidad de unión de FITC-E2 puede ser de aproximadamente 0,3 nM.

El dominio transmembrana y/o el dominio intracelular pueden comprender al menos una porción de un dominio de señalización citoplasmática. El dominio intracelular puede comprender al menos una porción de una molécula de señalización seleccionada del grupo que comprende CD3 ξ , CD28 y 4-1BB. El dominio intracelular puede comprender un receptor de Fc o una porción del mismo. El receptor de Fc o porción del mismo puede ser CD16 o una porción del mismo. La molécula de señalización puede comprender CD3 ξ . La molécula de señalización puede comprender CD28. La molécula de señalización puede comprender 4-1BB. El dominio intracelular puede comprender al menos una porción de CD3 ξ . El dominio intracelular puede comprender al menos una porción de CD28, el dominio intracelular puede comprender al menos una porción de 4-1BB, el dominio intracelular puede comprender al menos una porción de OX-40, el dominio intracelular puede comprender al menos una porción de CD30, el dominio intracelular puede comprender al menos una porción de CD40, el dominio intracelular puede comprender al menos una porción de CD2. El dominio intracelular puede comprender al menos una porción de CD27. El dominio intracelular puede comprender al menos una porción de PD-1. El dominio intracelular puede comprender al menos una porción de ICOS. El dominio intracelular puede comprender al menos una porción de antígeno-1 asociado a función de linfocitos (LFA-1). El dominio intracelular puede comprender al menos una porción de CD7. El dominio intracelular puede comprender al menos una porción de LIGHT. El dominio intracelular puede comprender al menos una porción de NKG2C. El dominio intracelular puede comprender al menos una porción de B7-H3. El dominio intracelular puede comprender al menos una porción de un dominio de señalización citoplasmática de una o más moléculas de señalización. El dominio intracelular puede comprender al menos una porción de dos o más dominios de señalización citoplasmática. Los dos o más dominios de señalización citoplasmática pueden ser de dos o más moléculas de señalización diferentes. El dominio intracelular puede comprender al menos una porción de tres o más dominios de señalización citoplasmática. El dominio intracelular puede comprender al menos una porción de cuatro o más dominios de señalización citoplasmática. El dominio intracelular puede comprender al menos una porción de un ligando que se une a una o más moléculas de señalización. El dominio intracelular puede comprender al menos una porción de un ligando que se une a CD83.

Plataforma de CAR-EC

Se dan a conocer en el presente documento plataformas de células efectoras con receptores de antígenos quiméricos (CAR-EC) que comprenden una célula efectora que expresa un receptor de antígeno quimérico (CAR); y un interruptor de célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) dado a conocer en el presente documento. El interruptor de CAR-EC puede ser homogéneo. El interruptor de CAR-EC puede ser estructuralmente homogéneo. El CAR-ID puede seleccionarse de una molécula pequeña de unión a CAR (CAR-ID) y un componente de unión a CAR (CAR-ID) dado a conocer en el presente documento. El TID puede seleccionarse de un dominio de interacción con la diana y un TID dado a conocer en el presente documento.

La plataforma de CAR-EC puede comprender una pluralidad de interruptores de CAR-EC, en la que al menos uno de

los interruptores de CAR-EC se da a conocer en el presente documento. La pluralidad de interruptores de CAR-EC puede comprender dos o más interruptores de CAR-EC. La pluralidad de interruptores de CAR-EC puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más interruptores de CAR-EC. La pluralidad de interruptores de CAR-EC puede comprender más de 20, más de 25, más de 30, más de 35, más de 40, más de 45 o más de 50 interruptores de CAR-EC. Los dos o más interruptores de CAR-EC pueden seleccionarse de uno o más interruptores de CAR-EC dados a conocer en el presente documento o una combinación de los mismos.

Los anticuerpos o péptidos dados a conocer en el presente documento pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales. El TID puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El CAR-ID y el TID pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales. El CAR-ID y el TID pueden unirse a través del uno o más aminoácidos no naturales. El CAR-ID y el TID pueden unirse a través de 2 aminoácidos no naturales. El CAR-ID y el TID pueden unirse a través de 3 aminoácidos no naturales. Uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a uno o más residuos de aminoácido del TID. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar a cualquier aminoácido de los péptidos o anticuerpos dados a conocer en el presente documento.

Las plataformas de CAR-EC dadas a conocer en el presente documento pueden comprender además dos o más interruptores de CAR-EC. Dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender dos o más CAR-ID idénticos. Dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender dos o más CAR-ID diferentes. Dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender dos o más CAR-ID similares. Los dos o más CAR-ID pueden comprender secuencias de aminoácidos similares. Las secuencias de aminoácidos de los dos o más CAR-ID pueden ser aproximadamente el 99%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5% o aproximadamente el 2% idénticas. Las secuencias de aminoácidos de los dos o más CAR-ID pueden ser aproximadamente el 75% idénticas.

Dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender dos o más TID diferentes. Dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender dos o más TID idénticos. Los dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender dos o más TID similares. Los dos o más TID pueden comprender secuencias de aminoácidos similares. Las secuencias de aminoácidos de los dos o más TID pueden ser aproximadamente el 99%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5% o aproximadamente el 2% idénticas. Las secuencias de aminoácidos de los dos o más TID pueden ser aproximadamente el 75% idénticas.

Dianas de CAR-EC

Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden dirigir una o más células efectoras con receptores de antígenos quiméricos (CAR-EC) a una o más dianas. Generalmente, la unión de la CAR-EC y la diana al interruptor de CAR-EC pone la diana en proximidad con la CAR-EC que es suficientemente cercana como para que una actividad de la CAR-EC tenga un efecto sobre la diana. Por ejemplo, cuando la CAR-EC y la diana se unen al interruptor de CAR-EC, la CAR-EC puede liberar citocinas que se unen a receptores de citocina en la diana. Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden dirigir una o más células efectoras con receptores de antígenos quiméricos (CAR-EC) a dos o más dianas. Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden dirigir una o más células efectoras con receptores de antígenos quiméricos (CAR-EC) a tres o más dianas. Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden dirigir cuatro o más células efectoras con receptores de antígenos quiméricos (CAR-EC) a una o más dianas. Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden dirigir cinco o más células efectoras con receptores de antígenos quiméricos (CAR-EC) a una o más dianas. Los interruptores dados a conocer en el presente documento pueden dirigir 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más células efectoras con receptores de antígenos quiméricos (CAR-EC) a una o más dianas. Las dos o más dianas pueden ser iguales. Las dos o más dianas pueden ser del mismo tipo de célula. Las dos o más dianas pueden ser del mismo linaje celular. Las dos o más dianas pueden ser diferentes. Las dos o más dianas pueden ser de tipos de células diferentes. Las dos o más dianas pueden ser de linajes celulares diferentes. Al menos dos de las tres o más dianas pueden ser iguales. Al menos dos de las tres o más dianas pueden ser del mismo tipo de célula. Al menos dos de las tres o más dianas pueden ser del mismo linaje celular. Al menos dos de las tres o más dianas pueden ser diferentes. Al menos dos de las tres o más dianas pueden ser de tipos de células diferentes. Al menos dos de las tres o más dianas pueden ser de linajes celulares diferentes.

La diana puede ser una célula. La diana puede ser un fragmento de una célula. La diana puede ser una o más células. La diana puede comprender una célula de un sujeto que padece una enfermedad o estado. La diana puede comprender una célula infectada. La diana puede comprender una célula infectada de manera patógena. La diana

5 puede comprender una célula enferma. La diana puede ser una célula cancerosa. La diana puede ser una célula modificada genéticamente. La diana puede ser una o más células que se dividen. La diana puede comprender una célula que es foránea para un sujeto. La diana puede proceder de un organismo invasor (por ejemplo, levadura, gusano, bacterias, hongo). La diana puede ser un patógeno. La diana pueden ser bacterias. La diana puede ser un virus o una porción del mismo.

10 La diana puede seleccionarse de una célula madre, una célula madre de cáncer, una célula pluripotente, una célula madre hematopoyética o una célula progenitora endotelial. La diana puede derivarse de un tejido. El tejido puede seleccionarse de cerebro, esófago, mama, colon, pulmón, glía, ovario, útero, testículos, próstata, tubo gastrointestinal, vejiga, hígado, timo, hueso y piel. La diana puede derivarse de una o más glándulas endocrinas. Alternativa o adicionalmente, la diana puede derivarse de una o más glándulas endocrinas. La glándula endocrina puede ser una glándula linfática, hipófisis, glándula tiroideas, glándula paratiroides, páncreas, gónada o glándula pineal.

15 La diana puede comprender una célula cancerosa. La célula cancerosa puede derivarse de un tejido. El tejido puede seleccionarse de cerebro, esófago, mama, colon, pulmón, glía, ovario, útero, testículos, próstata, tubo gastrointestinal, vejiga, hígado, timo y piel. La célula cancerosa puede derivarse de hueso. La célula cancerosa puede derivarse de sangre. La célula cancerosa puede derivarse de una célula B, una célula T, un monocito, un trombocito, un leucocito, un neutrófilo, un eosinófilo, un basófilo, un linfocito, una célula madre hematopoyética o un progenitor de células endoteliales. La célula cancerosa puede derivarse de un linfocito B positivo para CD19. La célula cancerosa puede derivarse de una célula madre. La célula cancerosa puede derivarse de una célula pluripotente. La célula cancerosa puede derivarse de una o más glándulas endocrinas. La glándula endocrina puede ser una glándula linfática, hipófisis, glándula tiroidea, glándula paratiroidea, páncreas, gónada o glándula pineal.

20 La diana puede ser una célula positiva para CD-19. La diana puede ser un linfocito B positivo para CD19. La diana puede ser una célula positiva para Her2. La célula positiva para Her2 puede ser una célula de cáncer de mama positiva para Her2. La diana puede ser una célula positiva para BCMA. La diana puede ser una célula de mieloma múltiple positiva para BCMA. La diana puede ser una célula positiva para CS1. La célula positiva para CS1 puede ser una célula de mieloma múltiple. La diana puede ser una célula positiva para EGFRvIII. La diana puede ser una célula positiva para CD20. La diana puede ser una célula positiva para PSMA. La diana puede ser una célula de cáncer de próstata positiva para PSMA. La diana puede ser una célula positiva para receptor de folato. La diana puede ser una célula de cáncer de ovario positiva para receptor de folato.

35 *Moléculas de superficie en dianas de CAR-EC*

40 El dominio de interacción con la diana (TID) de los interruptores dados a conocer en el presente documento puede unirse a o interactuar con una molécula en una diana. El TID puede unirse a un antígeno, una proteína, un péptido o una biomolécula en una diana. La proteína puede ser una enzima. La enzima puede tener actividad enzimática. Una biomolécula, mediante ejemplo no limitativo, puede seleccionarse de una fibra, un biopolímero (por ejemplo, colágeno), un glicano, un glicolípido, un proteoglicano, un lípido, un esteroide, un hidrato de carbono, un ácido nucleico y un fragmento celular. El antígeno puede ser al menos una porción de un antígeno de superficie o un marcador de superficie celular en una célula. El antígeno puede ser un receptor o un correceptor en una célula.

45 El TID puede unirse a un antígeno en una diana. El antígeno puede ser un antígeno de superficie en una diana. El antígeno puede seleccionarse de una proteína, un lípido, un glicolípido, un hidrato de carbono, un polisacárido, un ácido nucleico o una combinación de los mismos. El antígeno puede comprender partes (por ejemplo, recubrimientos, cápsulas, paredes celulares, flagelos, fimbrias y toxinas) de bacterias, virus y otros microorganismos. El antígeno puede comprender un glicano. El antígeno puede comprender un lípido. El antígeno puede comprender un glicolípido. El antígeno puede comprender un hidrato de carbono. El antígeno puede comprender una proteína. El antígeno puede comprender una modificación. La modificación, mediante ejemplo no limitativo, puede ser una fosforilación, una acetilación, una miristoilación, una palmitoilación o una metilación. El antígeno puede comprender un antígeno de membrana específico de la próstata.

50 El antígeno puede provocar la producción de uno o más anticuerpos. El antígeno puede referirse a una molécula o fragmento molecular al que puede unirse el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y presentarse a un receptor de células T. El término "antígeno" puede referirse también a un inmunógeno. El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria adaptativa si se inyecta por sí mismo en un sujeto. El inmunógeno puede inducir una respuesta inmunitaria por sí mismo. El antígeno puede ser un superantígeno, antígeno dependiente de T o un antígeno independiente de T.

55 El antígeno puede ser un antígeno exógeno o antígeno endógeno. Los antígenos exógenos son normalmente antígenos que han entrado en el cuerpo desde el exterior, por ejemplo mediante inhalación, ingestión o inyección. Algunos antígenos pueden comenzar como antígenos exógenos, y posteriormente convertirse en endógenos (por ejemplo, virus intracelulares). Los antígenos intracelulares pueden liberarse de nuevo a la circulación tras la destrucción de la célula infectada, de nuevo. Los antígenos endógenos pueden ser antígenos que se han generado dentro de células previamente normales como resultado del metabolismo celular normal, o debido a infección

bacteriana intracelular o viral.

5 El antígeno puede incluir también autoantígenos. Un autoantígeno puede ser una proteína normal o complejo de proteínas (y algunas veces ADN o ARN) que reconoce el sistema inmunitario de pacientes que padecen una enfermedad autoinmunitaria específica. Estos antígenos, en condiciones normales, no deben ser la diana del sistema inmunitario, pero, debido a factores principalmente genéticos y medioambientales, la tolerancia inmunológica normal para un antígeno de este tipo se ha perdido en estos pacientes.

10 El antígeno puede incluir un antígeno tumoral. Los antígenos tumorales o neoantígenos pueden ser antígenos que presentan moléculas del CMH I o CMH II en la superficie de células tumorales. Estos antígenos pueden presentarse algunas veces por células tumorales y nunca por las normales. En este caso, se denominan antígenos específicos de tumor (TSA) y, en general, resultan de una mutación específica de tumor. Más comunes son antígenos que se presentan por células tumorales y células normales, y se denominan antígenos asociados a tumor (TAA). Linfocitos T citotóxicos que reconocen estos antígenos pueden ser capaces de destruir las células tumorales antes de que proliferen o produzcan metástasis. Los antígenos tumorales pueden estar también en la superficie del tumor en forma de, por ejemplo, un receptor mutado, en cuyo caso pueden reconocerse por células B.

20 El antígeno puede ser un receptor. El receptor puede ser un receptor extracelular. El receptor puede ser un receptor de superficie celular. El receptor puede unirse a una hormona, un neurotransmisor, una citocina, un factor de crecimiento o una molécula de reconocimiento celular. El receptor puede ser un receptor transmembrana. El receptor puede ser un receptor unido a enzima.

25 El TID puede unirse a una molécula de superficie. La molécula de superficie, mediante ejemplo no limitativo, puede seleccionarse de un antígeno, un receptor, un correceptor, una proteína transmembrana o un marcador celular en la diana. La proteína de superficie celular puede seleccionarse de un receptor de colecistocinina B, un receptor de hormona liberadora de gonadotropina, un receptor de somatostatina 2, una integrina avb3, un receptor de péptido liberador de gastrina, un receptor de neurocinina 1, un receptor de melanocortina 1, un receptor de neurotensina, receptor de neuropéptido Y y molécula 1 similar a lectina de tipo C.

30 El TID puede unirse a una diana que es al menos aproximadamente el 5%, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 98% o aproximadamente el 100% homóloga a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El TID puede unirse a una diana que es al menos aproximadamente el 50% homóloga a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El TID puede unirse a una diana que es al menos aproximadamente el 70% homóloga a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El TID puede unirse a una diana que es al menos aproximadamente el 85% homóloga a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El TID puede comprender un ligando, activador, molécula de unión o un derivado de los mismos de antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El TID puede comprender un inhibidor de antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), o un derivado del mismo. PSMA puede denominarse también glutamato carboxipeptidasa II y N-acetil-L-aspartil-L-glutamato peptidasa I. El inhibidor de PSMA puede ser ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureidol]pentanodioico o un derivado del mismo.

45 El TID puede unirse a una diana que es al menos aproximadamente el 5%, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 98% o aproximadamente el 100% homóloga a un receptor de folato. El TID puede unirse a una diana que es al menos aproximadamente el 50% homóloga a un receptor de folato. El TID puede unirse a una diana que es al menos aproximadamente el 70% homóloga a un receptor de folato. El TID puede unirse a una diana que es al menos aproximadamente el 85% homóloga a un receptor de folato. El TID puede seleccionarse de un ligando de receptor de folato, un inhibidor de receptor de folato, un activador de receptor de folato, una molécula de unión a receptor de folato o un derivado de los mismos. El TID puede comprender folato o un derivado del mismo. El TID puede consistir esencialmente en folato o un derivado del mismo.

60 El receptor puede ser un receptor acoplado a proteína G (GPCR). El receptor GPCR puede ser un receptor de GNRH, receptor de endotelina, receptor de Smoothened, Frizzled, CXCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CCR7, receptor CCK2, receptor de SIP, un receptor activado por proteasa (PAR) o porción del mismo. El receptor puede ser un receptor unido a canal iónico. El receptor unido a canal iónico puede tener un canal de potasio activado por voltaje, un canal de calcio activado por voltaje, un canal de potencial de receptor transitorio, un canal de potencial de receptor transitorio de tipo melastatina (por ejemplo, TRPM1, TRPM7, TRPM8), un canal vaillinoide (por ejemplo, TRPV6) o un canal de sodio epitelial.

65

El TID puede interactuar con un receptor en una diana. El receptor puede ser un receptor de factor de crecimiento. El receptor de factor de crecimiento puede ser receptor de factor de crecimiento epidérmico, receptor de factor de crecimiento de fibroblastos, receptor de factor de crecimiento derivado de las plaquetas, receptor de factor de crecimiento nervioso, receptor de factor de crecimiento transformante, receptor de factor de crecimiento de proteína morfogénica ósea, receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, receptor de factor de crecimiento endotelial vascular, receptor de factor de células madre, receptor de factor de crecimiento de insulina, receptor de somatomedina o receptor de eritropoyetina. El receptor puede ser un receptor de hormona. El receptor puede ser un receptor de insulina. El receptor puede ser un receptor de eicosanoides, un receptor de prostaglandina, un receptor de estrógenos, un receptor de hormona folículo estimulante, un receptor de progesterona, un receptor de hormona del crecimiento o un receptor de hormona liberadora de gonadotropina. El receptor puede ser un receptor adrenérgico. El receptor puede ser una integrina. El receptor puede ser un receptor de Eph.

El receptor puede ser un receptor inmunitario. El receptor inmunitario puede ser un receptor de reconocimiento de patrón, un receptor de tipo peaje, un receptor de tipo NOD, un receptor activado por células citolíticas, un receptor de inhibidor de células citolíticas, un receptor de Fc, un receptor de células B, un receptor del complemento, un receptor de quimiocinas o un receptor de citocinas. El receptor de citocinas puede ser un receptor de interleucina, un receptor de interferón, un receptor de factor de crecimiento transformante, un receptor de factor de necrosis tumoral o un receptor de factor estimulante de colonias.

El receptor puede ser una cinasa receptora. La cinasa receptora puede ser un receptor tirosina cinasa. La cinasa receptora puede ser un receptor serina cinasa. La cinasa receptora puede ser un receptor treonina cinasa. La cinasa receptora puede activar una Ras, una Raf, PI3K, PKA, PKC, AKT, AMPK o una fosfolipasa. La cinasa receptora puede activar una ruta de señalización de MAPK/ERK. La cinasa receptora puede activar Jak, Stat o Smad.

El TID puede interactuar con una molécula de superficie que comprende un glicolípido. El TID puede interactuar con una molécula de superficie que comprende un hidrato de carbono. El TID puede interactuar con una molécula de superficie que comprende una proteína de agrupación de diferenciación (CD). El TID puede interactuar con una molécula de superficie que se selecciona del grupo que consiste en CD34, CD31, CD117, CD45, CD11b, CD15, CD24, CD114, CD182, CD14, CD11a, CD91, CD16, CD3, CD4, CD25, Foxp3, CD8, CD38, CD61, CD56, CD30, CD13 y CD33.

Kits, vectores y polinucleótidos

Se dan a conocer en el presente documento kits que comprenden uno o más interruptores de CAR-EC dados a conocer en el presente documento. El kit puede comprender además dos o más interruptores de CAR-EC. El kit puede comprender tres interruptores de CAR-EC. El kit puede comprender aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 24, 30, 35, 48, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 120, 150, 200, 300, 384, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 interruptores de CAR-EC. Un kit que comprende dos o más interruptores de CAR-EC puede comprender dos o más aminoácidos no naturales idénticos. Los dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender dos o más aminoácidos no naturales diferentes. Los dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender dos o más aminoácidos no naturales similares. Los dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender dos o más aminoácidos no naturales en sitios diferentes. Los dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender dos o más aminoácidos no naturales en sitios contiguos. El kit puede emplearse para investigación biológica. El kit puede usarse para diagnosticar una enfermedad o un estado. El kit puede usarse para tratar una enfermedad o estado. El kit puede comprender además una o más células efectoras. La célula efectora puede ser una célula T. La célula efectora puede expresar uno o más CAR. El kit puede comprender además un polinucleótido que codifica para un anticuerpo/péptido de un CAR. El kit puede comprender además un vector que comprende un polinucleótido que codifica para un anticuerpo/péptido de un CAR. El CAR puede seleccionarse de cualquiera de los CAR dados a conocer en el presente documento.

Los anticuerpos y/o péptidos de interruptores de CAR-EC dados a conocer en el presente documento pueden estar codificados por uno o más polinucleótidos seleccionados de SEQ ID NO: 5-9. Los CAR o porciones de los mismos pueden estar codificados por un polinucleótido al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o el 95% idéntico a uno o más polinucleótidos seleccionados de SEQ ID NO: 5-9. Los anticuerpos y/o péptidos de interruptores de CAR-EC dados a conocer en el presente documento pueden estar codificados por un polinucleótido que puede ser al menos aproximadamente el 70% idéntico a uno o más polinucleótidos seleccionados de SEQ ID NO: 5-9. Se dan a conocer en el presente documento vectores que comprenden uno o más polinucleótidos seleccionados de SEQ ID NO: 5-9.

Uso terapéutico

Los interruptores de células efectoras con receptores de antígenos quiméricos (CAR-EC) y productos intermedios de interruptores pueden usarse en el tratamiento de una enfermedad o estado en un sujeto que lo necesita. Los interruptores o los productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad. Los métodos de tratamiento de una enfermedad o estado en un sujeto que lo necesita pueden comprender administrar cualquiera de los interruptores

5 dados a conocer en el presente documento al sujeto. El interruptor puede comprender un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) y un dominio de interacción con la diana (TID). El interruptor puede comprender además uno o más CAR-ID adicionales. El interruptor puede comprender un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende una molécula pequeña. El CAR-ID puede comprender FITC.

10 El CAR-ID puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El interruptor puede comprender además uno o más TID. El interruptor puede comprender un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un polipéptido que se basa en o se deriva de un anticuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD 19. El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El anticuerpo puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender un polipéptido que comprende un aminoácido no natural. El CAR-ID y el TID pueden unirse de manera específica de sitio. La unión específica de sitio del CAR-ID al TID puede producirse a través del aminoácido no natural. El CAR-ID y el TID pueden unirse de una manera independiente del sitio. El interruptor puede comprender un TID que comprende una molécula pequeña. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. El TID puede comprender folato. El interruptor puede comprender además un ligador. El interruptor puede comprender además uno o más ligadores adicionales. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender una azida. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser 1,2,3-triazol. El triazol puede ser 1,2,4-triazol.

20 Alternativa o adicionalmente, el método puede comprender además administrar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC). La CAR-EC puede expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR). El CAR puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1-4. El CAR puede comprender un dominio externo que se basa en o se deriva de un anticuerpo. El dominio externo del CAR puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-FITC. El dominio externo del CAR puede basarse en o derivarse de un scFv anti-FITC.

25 El interruptor y la CAR-EC pueden administrarse simultáneamente. El interruptor y la CAR-EC pueden administrarse secuencialmente.

30 El método de tratamiento de una enfermedad o estado en un sujeto que lo necesita puede comprender administrar uno o más productos intermedios de interruptores al sujeto. El producto intermedio de interruptor puede comprender un CAR-ID y un ligador, en el que el ligador comprende un grupo funcional reactivo. El producto intermedio de interruptor puede comprender un TID y un ligador. El producto intermedio de interruptor puede comprender un TID y un ligador, en el que el ligador comprende un grupo funcional reactivo. El producto intermedio de interruptor puede comprender un CAR-ID que comprende un grupo funcional reactivo. El producto intermedio de interruptor puede comprender un TID que comprende un grupo funcional reactivo. Un primer producto intermedio de interruptor que comprende un CAR-ID puede combinarse con un segundo producto intermedio de interruptor que comprende un TID. Un primer producto intermedio de interruptor que comprende un CAR-ID y un ligador puede combinarse con un segundo producto intermedio de interruptor que comprende un TID. Un primer producto intermedio de interruptor que comprende un CAR-ID puede combinarse con un segundo producto intermedio de interruptor que comprende un TID y un ligador. Un primer producto intermedio de interruptor que comprende un CAR-ID y un primer ligador puede combinarse con un segundo producto intermedio de interruptor que comprende un TID y un segundo ligador. El primer producto intermedio de interruptor puede comprender un primer grupo funcional reactivo. El segundo producto intermedio de interruptor puede comprender un segundo grupo funcional reactivo. El primer grupo funcional reactivo del primer interruptor y el segundo grupo funcional reactivo del segundo interruptor pueden interactuar entre sí. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. El CAR-ID puede comprender FITC. El CAR-ID puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de un anticuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD 19. El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El anticuerpo puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender un polipéptido que comprende un aminoácido no natural. El TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. El TID puede comprender folato. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender una azida. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser 1,2,3-triazol. El triazol puede ser 1,2,4-triazol.

60 Los métodos pueden comprender administrar uno o más interruptores de CAR-EC. Los métodos pueden comprender administrar aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 24, 30, 35, 48, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 120, 150, 200, 300, 384, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más interruptores de CAR-EC. Los métodos pueden comprender administrar dos o más interruptores de CAR-EC. Los dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender el mismo CAR-ID. Los dos más interruptores de CAR-EC pueden comprender los mismos TID. Los dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender los mismos ligadores. Los dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender uno o más CAR-ID diferentes. Los dos más interruptores de CAR-EC pueden comprender uno o más TID diferentes. Los dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender uno o más ligadores diferentes. Los dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales idénticos. Los dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales diferentes. Los dos o más

interruptores de CAR-EC pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales similares. Los dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales en el mismo sitio. Por ejemplo, un primer TID de un primer interruptor de CAR-EC puede comprender un aminoácido no natural en la posición 309 y un segundo TID de un segundo interruptor de CAR-EC puede comprender un aminoácido no natural en la posición 309. Los dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales en sitios diferentes. Por ejemplo, un primer TID de un primer interruptor de CAR-EC puede comprender un aminoácido no natural en la posición 110 y un segundo TID de un segundo interruptor de CAR-EC puede comprender un aminoácido no natural en la posición 205. Los dos o más interruptores de CAR-EC pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales en sitios contiguos. Por ejemplo, un primer TID de un primer interruptor de CAR-EC puede comprender un aminoácido no natural en la posición 202 y un segundo TID de un segundo interruptor de CAR-EC puede comprender un aminoácido no natural en la posición 203. Los aminoácidos no naturales pueden estar dentro de los TID. Los aminoácidos no naturales pueden estar dentro de los CAR-ID.

Se dan a conocer en el presente documento métodos de tratamiento de una enfermedad o estado en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar un interruptor de célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) dado a conocer en el presente documento al sujeto, en el que el interruptor de CAR-EC comprende: una molécula pequeña de unión a receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que se une a un receptor de antígeno quimérico (CAR) en una CAR-EC; y un dominio de interacción con la diana (TID) que se une a una molécula de superficie en una diana y que comprende un aminoácido no natural. El CAR-ID y TID pueden unirse de manera específica de sitio a través del aminoácido no natural. El CAR-ID, mediante ejemplo no limitativo, puede ser FITC. El TID, mediante ejemplo no limitativo, puede seleccionarse de un anticuerpo anti-CD 19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El interruptor de CAR-EC puede comprender además un ligador. El ligador puede conectar el CAR-ID al TID. El ligador puede conectarse al aminoácido no natural dentro del TID. El ligador puede unirse al TID mediante ligación de oxima. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender una azida. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser 1,2,3-triazol. El triazol puede ser 1,2,4-triazol. Alternativa o adicionalmente, el método puede comprender además administrar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC). La CAR-EC puede expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR). El CAR puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1-4. El CAR puede comprender un dominio externo que se basa en o se deriva de un anticuerpo. El dominio externo del CAR puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-FITC. El dominio externo del CAR puede basarse en o derivarse de un scFv anti-FITC. El interruptor y la CAR-EC pueden administrarse simultáneamente. El interruptor y la CAR-EC pueden administrarse secuencialmente. La enfermedad o estado puede ser cáncer. El cáncer puede ser cáncer de próstata. El cáncer puede ser cáncer de mama. El cáncer puede ser leucemia.

Se dan a conocer en el presente documento métodos de tratamiento de una enfermedad o estado en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar un interruptor de célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) al sujeto, en el que el interruptor de CAR-EC comprende: un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID); y un dominio de interacción con la diana (TID), en el que el CAR-ID y el TID no comprenden dos o más aminoácidos unidos por un enlace amida. El CAR-ID puede ser una molécula pequeña. El CAR-ID, mediante ejemplo no limitativo puede ser FITC. El TID puede ser una molécula pequeña. El TID puede ser folato o un derivado del mismo. El TID puede interactuar con una molécula de superficie en una diana que es al menos el 50% homóloga a un antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El TID puede ser ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. El interruptor de CAR-EC puede comprender además un ligador. El ligador puede conectar el CAR-ID al TID. El ligador puede conectarse al aminoácido no natural dentro del TID. El ligador puede unirse al TID mediante ligación de oxima. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender una azida. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser 1,2,3-triazol. El triazol puede ser 1,2,4-triazol. Alternativa o adicionalmente, el método puede comprender además administrar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC). La CAR-EC puede expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR). El CAR puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1-4. El CAR puede comprender un dominio externo que se basa en o se deriva de un anticuerpo. El dominio externo del CAR puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-FITC. El dominio externo del CAR puede basarse en o derivarse de un scFv anti-FITC. El interruptor y la CAR-EC pueden administrarse simultáneamente. El interruptor y la CAR-EC pueden administrarse secuencialmente. La enfermedad o estado puede ser cáncer.

Los interruptores o los productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad. El interruptor puede comprender un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) y un dominio de interacción de direccionamiento (TID). El interruptor puede comprender además uno o más ligadores. El interruptor puede comprender además uno o más CAR-ID adicionales. El interruptor puede comprender además uno o más TID. Los CAR-ID pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales. Los TID pueden comprender uno o más

aminoácidos no naturales. El CAR-ID y el TID pueden unirse de manera específica de sitio. La unión específica de sitio del CAR-ID al TID puede producirse a través del aminoácido no natural. El CAR-ID y el TID pueden unirse de una manera independiente del sitio. El producto intermedio de interruptor puede comprender un CAR-ID y un ligador. El producto intermedio de interruptor puede comprender un CAR-ID y un ligador, en el que el ligador comprende un grupo funcional reactivo. El producto intermedio de interruptor puede comprender un TID y un ligador. El producto intermedio de interruptor puede comprender un TID y un ligador, en el que el ligador comprende un grupo funcional reactivo. El producto intermedio de interruptor puede comprender un CAR-ID que comprende un grupo funcional reactivo. El producto intermedio de interruptor puede comprender un TID que comprende un grupo funcional reactivo. Un primer producto intermedio de interruptor que comprende un CAR-ID puede combinarse con un segundo producto intermedio de interruptor que comprende a TID. Un primer producto intermedio de interruptor que comprende un CAR-ID y un ligador puede combinarse con un segundo producto intermedio de interruptor que comprende a TID. Un primer producto intermedio de interruptor que comprende un CAR-ID puede combinarse con un segundo producto intermedio de interruptor que comprende un TID y un ligador. Un primer producto intermedio de interruptor que comprende un CAR-ID y un primer ligador puede combinarse con un segundo producto intermedio de interruptor que comprende un TID y un segundo ligador. El primer producto intermedio de interruptor puede comprender un primer grupo funcional reactivo. El segundo producto intermedio de interruptor puede comprender un segundo grupo funcional reactivo. El primer grupo funcional reactivo del primer interruptor y segundo grupo funcional reactivo del segundo interruptor pueden interactuar entre sí.

Se da a conocer en el presente documento el uso de un interruptor que comprende un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico (CAR) en una célula efectora; y un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural, en el que el TID interacciona con una molécula de superficie en una diana para tratar una enfermedad o estado en un sujeto que lo necesita. El CAR-ID y el TID pueden unirse. El CAR-ID y el TID pueden unirse de manera específica de sitio. La unión específica de sitio del CAR-ID al TID puede comprender unir el CAR-ID al aminoácido no natural en el TID. El interruptor puede comprender además un ligador. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. El CAR-ID puede comprender FITC. El CAR-ID puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de un anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD 19. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-EGFR. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD20. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-HER2. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El anticuerpo puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender un polipéptido que comprende un aminoácido no natural. El TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. El TID puede comprender folato. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender una azida. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser 1,2,3-triazol. El triazol puede ser 1,2,4-triazol. La enfermedad puede ser cáncer. El cáncer puede ser cáncer de próstata. El cáncer puede ser cáncer de mama. El cáncer puede ser leucemia.

Se da a conocer en el presente documento el uso de un interruptor que comprende un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico (CAR) en una célula efectora; y un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural, en el que el TID interacciona con una molécula de superficie en una diana en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad. El CAR-ID y el TID pueden unirse. El CAR-ID y el TID pueden unirse de manera específica de sitio. La unión específica de sitio del CAR-ID al TID puede comprender unir el CAR-ID al aminoácido no natural en el TID. El interruptor puede comprender además un ligador. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. El CAR-ID puede comprender FITC. El CAR-ID puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de un anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD 19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD 19. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-EGFR. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD20. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-HER2. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 10-17. El anticuerpo puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-9. El TID puede comprender un polipéptido que se basa en o se deriva de una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56. El TID puede comprender un polipéptido que comprende un aminoácido no natural. El TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. El TID puede comprender folato. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender una azida. El ligador puede comprender triazol.

El triazol puede ser 1,2,3-triazol. El triazol puede ser 1,2,4-triazol. La enfermedad puede ser cáncer. El cáncer puede ser cáncer de próstata. El cáncer puede ser cáncer de mama. El cáncer puede ser leucemia.

Se da a conocer además en el presente documento el uso de un interruptor que comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende FITC o derivado del mismo; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que interacciona con una molécula de superficie en una diana para el tratamiento de una enfermedad o un estado en un sujeto. El TID puede comprender un polipéptido. El polipéptido puede basarse en o derivarse de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD 19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD19. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El TID puede comprender un polipéptido que comprende un aminoácido no natural. El CAR-ID puede unirse al TID. El CAR-ID puede unirse de manera específica de sitio al TID. El CAR-ID puede unirse de manera específica de sitio al TID por medio del aminoácido no natural. El CAR-ID puede unirse al TID de una manera independiente del sitio. El interruptor puede comprender además un ligador. El ligador puede unir el CAR-ID al TID. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender una azida. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser 1,2,3-triazol. El triazol puede ser 1,2,4-triazol. El TID puede comprender interaccionar con una molécula de superficie en una diana. La molécula de superficie puede ser CD19. La CD19 puede estar en una célula B. La CD19 puede estar en una célula plasmática. La CD19 puede estar en una célula B plasmática. La CD19 puede ser un plasmocito. La CD19 puede estar en una célula B efectora. La enfermedad o el estado puede ser cáncer. El cáncer puede ser mieloma múltiple.

Se da a conocer además en el presente documento el uso de un interruptor que comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende FITC o derivado del mismo; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que interacciona con una molécula de superficie en una diana para el tratamiento de una enfermedad o un condición en un sujeto. El TID puede comprender un polipéptido. El polipéptido puede basarse en o derivarse de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD 19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-HER2. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El TID puede comprender un polipéptido que comprende un aminoácido no natural. El CAR-ID puede unirse al TID. El CAR-ID puede unirse de manera específica de sitio al TID. El CAR-ID puede unirse al TID de una manera independiente del sitio. El interruptor puede comprender además un ligador. El ligador puede unir el CAR-ID al TID. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender una azida. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser 1,2,3-triazol. El triazol puede ser 1,2,4-triazol. El TID puede comprender interaccionar con una molécula de superficie en una diana. La molécula de superficie puede ser Her2. El Her2 puede estar en una célula cancerosa. El Her2 puede estar en una célula de cáncer de mama. El Her2 puede estar en una célula que se origina a partir de un tejido de mama. La diana puede ser una célula que expresa Her2. La diana puede ser una célula que sobreexpresa Her2. La enfermedad o estado puede ser cáncer. El cáncer puede ser cáncer de mama.

Se da a conocer además en el presente documento el uso de un interruptor que comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende FITC o derivado del mismo; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que interacciona con una molécula de superficie en una diana para el tratamiento de una enfermedad o un condición en un sujeto. El TID puede comprender un polipéptido. El polipéptido puede basarse en o derivarse de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD 19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CS1. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El TID puede comprender un polipéptido que comprende un aminoácido no natural. El CAR-ID puede unirse al TID. El CAR-ID puede unirse de manera específica de sitio al TID. El CAR-ID puede unirse al TID de una manera independiente del sitio. El interruptor puede comprender además un ligador. El ligador puede unir el CAR-ID al TID. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender una azida. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser 1,2,3-triazol. El triazol puede ser 1,2,4-triazol. El TID puede comprender interaccionar con una molécula de superficie en una diana. La molécula de superficie puede ser CS1. La CS1 puede estar en una célula B. La CS1 puede estar en una célula plasmática. La CS1 puede estar en una célula B plasmática. La CS1 puede estar en un plasmocito. La CS1 puede estar en una célula B efectora. La enfermedad o estado puede ser cáncer. El cáncer puede ser mieloma múltiple.

Se da a conocer además en el presente documento el uso de un interruptor que comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende FITC o derivado del mismo; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que interacciona con una molécula de superficie en una diana para el tratamiento de una enfermedad o un estado en un sujeto. El TID puede comprender un polipéptido. El polipéptido puede basarse en o derivarse de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD 19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-BCMA. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El TID puede comprender un polipéptido que comprende un aminoácido no natural. El CAR-ID puede unirse al TID. El CAR-ID puede unirse de manera específica de sitio al TID. El CAR-ID puede unirse de manera específica de sitio al TID por medio del aminoácido no natural. El CAR-ID puede unirse al TID de una manera independiente del sitio. El interruptor puede comprender además un ligador. El ligador puede unir el CAR-ID al TID. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender una azida. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser 1,2,3-triazol. El triazol puede ser 1,2,4-triazol. El TID puede comprender interaccionar con una molécula de superficie en una diana. La molécula de superficie puede ser BCMA. El BCMA puede estar en una célula B. El BCMA puede estar en una célula plasmática. El BCMA puede estar en una célula B plasmática. El BCMA puede estar en un plasmocito. El BCMA puede estar en una célula B efectora. La enfermedad o estado puede ser cáncer. El cáncer puede ser mieloma múltiple.

Se da a conocer además en el presente documento el uso de un interruptor que comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende FITC o derivado del mismo; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que interacciona con una molécula de superficie en una diana para el tratamiento de una enfermedad o un estado en un sujeto. El TID puede comprender un polipéptido. El polipéptido puede basarse en o derivarse de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD 19, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-CLL-1 y un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-EGFRvIII. El TID puede comprender un fragmento de anticuerpo. El TID puede comprender un polipéptido que comprende un aminoácido no natural. El CAR-ID puede unirse al TID. El CAR-ID puede unirse de manera específica de sitio al TID. El CAR-ID puede unirse de manera específica de sitio al TID por medio del aminoácido no natural. El CAR-ID puede unirse al TID de una manera independiente del sitio. El interruptor puede comprender además un ligador. El ligador puede unir el CAR-ID al TID. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender una azida. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser 1,2,3-triazol. El triazol puede ser 1,2,4-triazol. El TID puede comprender interaccionar con una molécula de superficie en una diana. La molécula de superficie puede ser un receptor. El receptor puede ser un receptor de factor de crecimiento. El receptor de factor de crecimiento puede ser un EGFR. El EGFR puede ser un EGFRvIII. La molécula de superficie puede estar en una célula de un glioma. La molécula de superficie puede estar en una célula de un glioblastoma. La molécula de superficie puede estar en una célula glial. La molécula de superficie puede estar en una célula ependimal, astrocito u oligodendrocito. La enfermedad o estado puede ser cáncer. El cáncer puede ser un tumor cerebral. El cáncer puede ser glioma. El cáncer puede ser un glioblastoma.

Se da a conocer en el presente documento el uso de un interruptor que comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID); y (b) un dominio de interacción con la diana (TID), en el que el CAR-ID y el TID no comprenden dos o más aminoácidos unidos mediante un enlace amida para tratar una enfermedad o estado en un sujeto que lo necesita. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. El CAR-ID puede comprender FITC. El TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. El TID puede comprender folato. El interruptor puede comprender además un ligador. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender una azida. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser 1,2,3-triazol. El triazol puede ser 1,2,4-triazol. El CAR-ID puede unirse al TID. El CAR-ID puede unirse al TID de manera específica de sitio. El CAR-ID puede unirse a un sitio predeterminado en el TID. El CAR-ID puede unirse al TID mediante conjugación de un isotiocianato de FITC al TID. El CAR-ID puede unirse al TID mediante acoplamiento de éster. El ligador puede unir el CAR-ID al TID. El ligador puede unir el CAR-ID a un TID mediante una reacción de química "click". El ligador puede unirse al CAR-ID. El ligador puede unirse químicamente al CAR-ID. El ligador puede unirse al CAR-ID mediante una ligación de oxima. El CAR-ID puede unirse al ligador mediante conjugación de un isotiocianato de FITC con el ligador. El CAR-ID puede unirse al ligador mediante acoplamiento de éster. El ligador puede unirse al TID. El ligador puede unirse químicamente al TID. El ligador puede unirse al TID mediante una ligación de oxima. La enfermedad o estado puede ser cáncer. El cáncer puede ser cáncer de próstata. El cáncer puede ser cáncer de ovario.

Se da a conocer en el presente documento el uso de un interruptor de CAR-EC de molécula pequeña que comprende

(a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID); y (b) un dominio de interacción con la diana (TID), en el que el CAR-ID y el TID no comprenden dos o más aminoácidos unidos mediante un enlace amida en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad. El CAR-ID puede comprender una molécula pequeña. El CAR-ID puede comprender FITC. El TID puede comprender una molécula pequeña. El TID puede comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo. El TID puede comprender folato. El interruptor puede comprender además un ligador. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender una azida. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser 1,2,3-triazol. El triazol puede ser 1,2,4-triazol. El CAR-ID puede unirse al TID. El CAR-ID puede unirse al TID de manera específica de sitio. El CAR-ID puede unirse a un sitio predeterminado en el TID. El CAR-ID puede unirse al TID mediante conjugación de un isotiocianato de FITC con el TID. El CAR-ID puede unirse al TID mediante acoplamiento de éster. El ligador puede unir el CAR-ID al TID. El ligador puede unir el CAR-ID a un TID mediante una reacción de química "click". El ligador puede unirse al CAR-ID. El ligador puede unirse químicamente al CAR-ID. El ligador puede unirse al CAR-ID mediante una ligación de oxima. El CAR-ID puede unirse al ligador mediante conjugación de un isotiocianato de FITC con el ligador. El CAR-ID puede unirse al ligador mediante acoplamiento de éster. El ligador puede unirse al TID. El ligador puede unirse químicamente al TID. El ligador puede unirse al TID mediante una ligación de oxima. La enfermedad o estado puede ser cáncer. El cáncer puede ser cáncer de próstata. El cáncer puede ser cáncer de ovario.

Además se da a conocer en el presente documento el uso de un interruptor que comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende FITC; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico o un derivado del mismo para tratar una enfermedad o estado. La enfermedad o estado puede ser cáncer. El cáncer puede ser cáncer de próstata. El interruptor puede comprender además un ligador. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender una azida. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser 1,2,3-triazol. El triazol puede ser 1,2,4-triazol. El CAR-ID puede unirse al TID. El CAR-ID puede unirse al TID de manera específica de sitio. El CAR-ID puede unirse a un sitio predeterminado en el TID. El CAR-ID puede unirse al TID mediante conjugación de un isotiocianato de FITC con el TID. El CAR-ID puede unirse al TID mediante acoplamiento de éster. El ligador puede unir el CAR-ID al TID. El ligador puede unir el CAR-ID a un TID mediante una reacción de química "click". El ligador puede unirse al CAR-ID. El ligador puede unirse químicamente al CAR-ID. El ligador puede unirse al CAR-ID mediante una ligación de oxima. El CAR-ID puede unirse al ligador mediante conjugación de un isotiocianato de FITC con el ligador. El CAR-ID puede unirse al ligador mediante acoplamiento de éster. El ligador puede unirse al TID. El ligador puede unirse químicamente al TID. El ligador puede unirse al TID mediante una ligación de oxima.

Se da a conocer en el presente documento el uso de un interruptor que comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende FITC; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende folato o un derivado del mismo para tratar una enfermedad o estado. El ligador puede ser un ligador bifuncional. El ligador puede ser un ligador heterobifuncional. El ligador puede comprender una o más subunidades de polietilenglicol (PEG). El ligador puede comprender ciclooctino. El ligador puede ser un ligador de PEG-ciclooctino. El ligador puede comprender una azida. El ligador puede comprender triazol. El triazol puede ser 1,2,3-triazol. El triazol puede ser 1,2,4-triazol. El CAR-ID puede unirse al TID. El CAR-ID puede unirse al TID de manera específica de sitio. El CAR-ID puede unirse a un sitio predeterminado en el TID. El CAR-ID puede unirse al TID mediante conjugación de un isotiocianato de FITC con el TID. El CAR-ID puede unirse al TID mediante acoplamiento de éster. El ligador puede unir el CAR-ID al TID. El ligador puede unir el CAR-ID a un TID mediante una reacción de química "click". El ligador puede unirse al CAR-ID. El ligador puede unirse químicamente al CAR-ID. El ligador puede unirse al CAR-ID mediante una ligación de oxima. El CAR-ID puede unirse al ligador mediante conjugación de un isotiocianato de FITC con el ligador. El CAR-ID puede unirse al ligador mediante acoplamiento de éster. El ligador puede unirse al TID. El ligador puede unirse químicamente al TID. El ligador puede unirse al TID mediante una ligación de oxima. La enfermedad o estado puede ser cáncer. El cáncer puede ser cáncer de ovario.

Los métodos dados a conocer en el presente documento pueden comprender administrar una o más células efectoras. La una o más células efectoras pueden comprender una de las células efectoras con receptores de antígenos quiméricos (CAR-EC) dadas a conocer en el presente documento. La una o más células efectoras pueden comprender un polinucleótido que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR). El CAR puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1-4. El CAR puede comprender un dominio externo que se basa en o se deriva de un anticuerpo. El dominio externo del CAR puede basarse en o derivarse de un anticuerpo anti-FITC. El dominio externo del CAR puede basarse en o derivarse de un scFv anti-FITC. El interruptor y la CAR-EC pueden administrarse simultáneamente. El interruptor y la CAR-EC pueden administrarse secuencialmente. Los métodos pueden comprender administrar una primera célula efectora y una segunda célula efectora. La primera célula efectora y la segunda célula efectora pueden ser diferentes. La primera célula efectora y la segunda célula efectora pueden ser iguales. La primera célula efectora y la segunda célula efectora pueden ser del mismo tipo de célula. La primera célula efectora y la segunda célula efectora pueden ser del mismo linaje celular. La primera célula efectora puede comprender un CAR que tiene un primer dominio extracelular que se une a un primer CAR-ID de un primer interruptor de CAR-EC y la segunda célula efectora puede comprender un CAR que tiene un segundo dominio

extracelular que se une a un segundo CAR-ID de un segundo interruptor de CAR-EC. El primer CAR-ID y el segundo CAR-ID pueden ser diferentes. El primer CAR-ID y el segundo CAR-ID pueden ser iguales. El primer interruptor de CAR-IEC y el segundo interruptor de CAR-EC pueden ser diferentes. El primer interruptor de CAR-EC y el segundo interruptor de CAR-EC pueden comprender TID diferentes. El primer interruptor de CAR-EC y el segundo interruptor de CAR-EC pueden ser iguales. El primer interruptor de CAR-EC y el segundo interruptor de CAR-EC pueden comprender el mismo TID.

El interruptor de CAR-EC puede tener un efecto terapéutico porque pone a una célula efectora en proximidad de una célula diana. El efecto terapéutico sobre la indicación prevista del interruptor de CAR-EC puede deberse a que el interruptor de CAR-EC recluya una célula efectora a la célula diana. El efecto terapéutico sobre la indicación prevista del interruptor de CAR-EC puede deberse completamente a que el interruptor de CAR-EC recluta una célula efectora a la célula diana. El efecto terapéutico sobre la indicación prevista del interruptor de CAR-EC puede deberse predominantemente a que el interruptor de CAR-EC recluya una célula efectora a la célula diana.

El efecto terapéutico de la indicación prevista puede deberse a que el interruptor de CAR-EC recluya una proteína, péptido o biomolécula a la célula diana. El efecto terapéutico de la indicación prevista puede deberse completamente a que el interruptor de CAR-EC recluya una proteína, péptido o biomolécula a la célula diana. El efecto terapéutico sobre la indicación prevista puede deberse al menos parcialmente a que el interruptor de CAR-EC recluya una proteína, péptido o biomolécula a la célula diana.

Administrar el interruptor de CAR-EC puede no tener ningún efecto terapéutico sin administrar además una célula efectora. El interruptor de CAR-EC puede no tener un efecto terapéutico significativo, deseable y/o previsto sin administrar además una célula efectora. El interruptor de CAR-EC puede no tener ningún efecto terapéutico hacia una indicación prevista de la plataforma de CAR-EC sin administrar además una célula efectora. Una porción o componente del interruptor de CAR-EC (por ejemplo, TID) puede no tener un efecto terapéutico hacia la indicación prevista del interruptor de CAR-EC sin conjugarse a una segunda porción o componente del interruptor de CAR-EC (por ejemplo, CAR-ID). La dosis de una porción o componente del interruptor de CAR-EC (por ejemplo, CAR-ID, TID) cuando se administra como parte de la plataforma de CAR-EC para proporcionar un efecto terapéutico puede no tener un efecto terapéutico cuando la porción o el componente del interruptor de CAR-EC se administra solo a esa dosis. La porción o el componente del interruptor de CAR-EC puede no estar destinada a tener ningún efecto terapéutico además de reclutar la célula efectora a la célula diana. La porción o el componente del interruptor de CAR-EC puede tener un efecto terapéutico sobre la célula diana, en la que el efecto terapéutico es insignificante en relación con el efecto terapéutico del interruptor de CAR-EC que recluya la célula efectora, proteína, péptido o biomolécula a la célula diana. La porción o el componente del interruptor de CAR-EC puede tener un efecto terapéutico sobre la célula diana, en la que el efecto terapéutico es menor que el efecto terapéutico de reclutar la célula efectora, a la célula diana. La unión de la porción o el componente del interruptor de CAR-EC a la célula diana puede inducir una respuesta accidental de la célula diana. La unión de la porción o el componente del interruptor de CAR-EC a la célula diana puede inducir un efecto terapéutico accidental además del efecto terapéutico de reclutar la célula efectora, proteína, péptido o biomolécula a la célula diana.

Se dan a conocer en el presente documento plataformas, kits y métodos para tratar una enfermedad o estado en un sujeto. El sujeto puede padecer una enfermedad o estado. El sujeto puede padecer más de una enfermedad o estado. El sujeto puede padecer leucemia linfocítica crónica. El sujeto puede padecer leucemia linfoblástica aguda. El sujeto puede ser un animal. El sujeto puede ser un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano, un chimpancé, un gorila, un mono, un animal bovino, un caballo, un asno, una mula, un perro, un gato, un cerdo, un conejo, una cabra, una oveja, una rata, un hámster, una cobaya o un ratón. El sujeto puede ser un ave o un pollo. El sujeto puede ser un ser humano. El sujeto puede ser un adulto. El sujeto puede ser un niño. El niño puede padecer leucemia linfoblástica aguda. El sujeto puede ser menor de 6 meses de edad. El sujeto puede ser de al menos aproximadamente 1 año de edad, aproximadamente 2 años de edad, aproximadamente 3 años de edad, aproximadamente 4 años de edad, aproximadamente 5 años de edad, aproximadamente 6 años de edad, aproximadamente 7 años de edad, aproximadamente 8 años de edad, aproximadamente 9 años de edad, aproximadamente 10 años de edad, aproximadamente 11 años de edad, aproximadamente 12 años de edad, aproximadamente 13 años de edad, aproximadamente 14 años de edad o aproximadamente 15 años de edad. El sujeto puede ser de al menos aproximadamente 16 años de edad, aproximadamente 17 años o aproximadamente 18 años de edad. El sujeto puede ser de al menos aproximadamente 19 años de edad, aproximadamente 20 años de edad o aproximadamente 25 años de edad. El sujeto puede ser de al menos aproximadamente 30 años de edad, aproximadamente 35 años de edad, aproximadamente 40 años de edad, aproximadamente 45 años de edad, aproximadamente 50 años de edad, aproximadamente 55 años de edad. El sujeto puede ser de al menos aproximadamente 60 años de edad, aproximadamente 65 años de edad, aproximadamente 70 años de edad, aproximadamente 75 años de edad, aproximadamente 80 años de edad o aproximadamente 85 años de edad. El sujeto puede ser de aproximadamente 90 años de edad, aproximadamente 95 años de edad, aproximadamente 100 años de edad o aproximadamente 105 años de edad. El sujeto puede ser mayor de 65 años de edad. El sujeto puede ser menor de 30 años de edad.

Los interruptores y productos intermedios de interruptores dados a conocer en el presente documento pueden usarse para tratar una o más enfermedades o estados en un sujeto que lo necesita. La enfermedad o estado puede ser un cáncer, una infección patógena, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria o trastorno genético.

5 En algunos casos, la una o más enfermedades comprenden un cáncer. El cáncer puede comprender un cáncer recurrente y/o refractario. El cáncer puede ser un cáncer agudo. El cáncer puede ser un cáncer crónico. El cáncer puede ser un cáncer recurrente. El cáncer puede ser un cáncer refractario acelerado. El cáncer puede estar en remisión. El cáncer puede ser un cáncer en estadio I, estadio II, estadio III o estadio IV. El cáncer puede ser un cáncer juvenil. El cáncer puede ser un cáncer adulto. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, sarcomas, carcinomas, linfomas o leucemias. La enfermedad o estado puede ser un trastorno proliferativo celular. El trastorno proliferativo celular puede seleccionarse de un tumor sólido, un linfoma, una leucemia y un liposarcoma. El cáncer puede seleccionarse de leucemia mielógena, leucemia linfoblástica, leucemia mieloide, una leucemia mieloide aguda, leucemia mielomonocítica, leucemia neutrofilica, síndrome mielodisplásico, linfoma de células B, linfoma de Burkitt, linfoma de células grandes, linfoma de células mixtas, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de Hodgkin, linfoma linfocítico pequeño recurrente, tricoleucemia, mieloma múltiple, leucemia basófila, leucemia eosinófila, leucemia megacarioblástica, leucemia monoblástica, leucemia monocítica, ertroleucemia, leucemia eritroide y carcinoma hepatocelular. El cáncer puede comprender un tumor maligno hematológico. El tumor maligno hematológico puede comprender un tumor maligno de células B. El cáncer puede comprender una leucemia linfocítica crónica. El cáncer puede comprender una leucemia linfoblástica aguda. El cáncer puede comprender un linfoma de Burkitt positivo para CD19.

20 El cáncer puede comprender un cáncer neuroendocrino. El cáncer puede comprender un cáncer pancreático. El cáncer puede comprender un cáncer pancreático exocrino. El cáncer puede comprender un cáncer de tiroides. El cáncer de tiroides puede comprender un cáncer de tiroides medular.

25 El cáncer puede comprender un cáncer de próstata. El cáncer de próstata puede ser un cáncer de próstata positivo para PSMA. La expresión de PSMA puede estar sumamente regulada por incremento y restringida a células cancerosas en algunos o todos los estadios del cáncer de próstata. El cáncer puede ser cáncer de próstata refractario a hormonas.

30 El cáncer puede comprender un cáncer epitelial. El cáncer puede comprender un cáncer de mama. El cáncer puede comprender un cáncer endometrial. El cáncer puede comprender un cáncer de ovario. El cáncer de ovario puede comprender un cáncer de ovario estromal. El cáncer puede comprender un cáncer de cuello uterino.

El cáncer puede comprender un cáncer de piel. El cáncer de piel puede comprender un cáncer de piel neoangiogénico. El cáncer de piel puede comprender un melanoma.

35 El cáncer puede comprender un cáncer de riñón.

El cáncer puede comprender un cáncer de pulmón. El cáncer de pulmón puede comprender un cáncer de pulmón de células pequeñas. El cáncer de pulmón puede comprender un cáncer de pulmón de células no pequeñas.

40 El cáncer puede comprender un cáncer colorrectal. El cáncer puede comprender un cáncer gástrico. El cáncer puede comprender un cáncer de colon.

45 El cáncer puede comprender un cáncer de cerebro. El cáncer de cerebro puede comprender un tumor cerebral. El cáncer puede comprender un glioblastoma. El cáncer puede comprender un astrocitoma.

El cáncer puede comprender un cáncer sanguíneo. El cáncer sanguíneo puede comprender una leucemia. La leucemia puede comprender una leucemia mieloide. El cáncer puede comprender un linfoma. El linfoma puede comprender un linfoma no Hodgkin.

50 El cáncer puede comprender un sarcoma. Generalmente, los sarcomas son cánceres del hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos, u otro tejido conjuntivo o de soporte. Los sarcomas incluyen, pero no se limitan a, cáncer de hueso, fibrosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, hemangioendotelioma maligno, schwannoma maligno, schwannoma vestibular bilateral, osteosarcoma, sarcomas de tejidos blandos (por ejemplo, sarcoma de partes blandas alveolar, angiosarcoma, cistosarcoma filoide, dermatofibrosarcoma, tumor desmoide, sarcoma epitelioide, osteosarcoma extraesquelético, fibrosarcoma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, linfosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, neurofibrosarcoma, rabdomiosarcoma y sarcoma sinovial). El sarcoma puede comprender un sarcoma de Ewing.

60 El cáncer puede ser un carcinoma. Generalmente, los carcinomas son cánceres que comienzan en las células epiteliales, que son células que cubren la superficie del cuerpo, producen hormonas y constituyen glándulas. A modo de ejemplo no limitativo, los carcinomas incluyen cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, cáncer vaginal, cáncer vulvar, cáncer uterino, cáncer oral, cáncer de pene, cáncer testicular, cáncer esofágico, cáncer de piel, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de cabeza y cuello, cáncer estromal gastrointestinal, adenocarcinoma, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de la región anal, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la

5 glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, cáncer de la uretra, cáncer de la pelvis renal, cáncer del uréter, cáncer del endometrio, cáncer del cuello uterino, cáncer de la hipófisis, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma del SNC primario, glioma del tronco encefálico y tumores del eje espinal. En algunos casos, el cáncer es un cáncer de piel, tal como un carcinoma de células basales, escamoso, melanoma, distinto de melanoma o queratosis actínica (solar).

10 En algunos casos, el cáncer es un cáncer de pulmón. El cáncer de pulmón puede comenzar en las vías respiratorias que se ramifican de la tráquea que suministran a los pulmones (bronquios) o los sacos aéreos pequeños del pulmón (los alveolos). Los cánceres de pulmón incluyen carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma de pulmón de células pequeñas y mesotelioma. Los ejemplos de NSCLC incluyen carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes. El mesotelioma puede ser un tumor canceroso del revestimiento del pulmón y la cavidad torácica (pleura) o el revestimiento del abdomen (peritoneo). El mesotelioma puede deberse a la exposición a amianto. El cáncer puede ser un cáncer de cerebro, tal como un glioblastoma.

15 Alternativamente, el cáncer puede ser un tumor del sistema nervioso central (SNC). Los tumores del SNC pueden clasificarse como gliomas o distintos de gliomas. El glioma puede ser glioma maligno, glioma de alto grado, glioma pontino intrínseco difuso. Los ejemplos de gliomas incluyen astrocitomas, oligodendrogliomas (o mezclas de elementos de oligodendroglioma y astrocitoma) y ependimomas. Los astrocitomas incluyen, pero no se limitan a, astrocitomas de bajo grado, astrocitomas anaplásicos, glioblastoma multiforme, astrocitoma pilocítico, xantastrocitoma pleomórfico y astrocitoma de células gigantes subependimal. Los oligodendrogliomas incluyen oligodendrogliomas de bajo grado (o oligoastrocitomas) y oligodendriogliomas anaplásicos. Los distintos de gliomas incluyen meningiomas, adenomas hipofisarios, linfomas del SNC primarios y meduloblastomas. En algunos casos, el cáncer es un meningioma.

25 La leucemia puede ser una leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia linfocítica crónica o leucemia mielocítica crónica. Los tipos adicionales de leucemias incluyen tricoleucemia, leucemia mielomonocítica crónica y leucemia mielomonocítica juvenil.

30 Los linfomas son cánceres de los linfocitos y pueden desarrollarse a partir de o bien linfocitos B o bien T. Los dos tipos principales de linfoma son linfoma de Hodgkin, previamente conocido como enfermedad de Hodgkin, y linfoma no Hodgkin. El linfoma de Hodgkin está marcado por la presencia de la célula de Reed-Sternberg. Los linfomas no Hodgkin son todos los linfomas que no son linfoma de Hodgkin. Los linfomas no Hodgkin pueden ser linfomas indolentes y linfomas agresivos. Los linfomas no Hodgkin incluyen, pero no se limitan a, linfoma de células B grandes difuso, linfoma folicular, linfoma de tejido linfático asociado a la mucosa (MALT), linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes mediastinal, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de células B de zona marginal nodal (NMZL), linfoma de zona marginal esplénico (SMZL), linfoma de células B de zona marginal extranodal, linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de efusión primaria y granulomatosis linfomatoide.

40 El cáncer puede comprender un tumor sólido. El cáncer puede comprender un sarcoma. El cáncer puede seleccionarse de un grupo que consiste en un cáncer de vejiga, un cáncer de mama, un cáncer de colon, un cáncer rectal, un cáncer endometrial, un cáncer de riñón, un cáncer de pulmón, melanoma, un mieloma, un cáncer de tiroides, un cáncer pancreático, un glioma, un glioma maligno del cerebro, un glioblastoma, un cáncer de ovario, un cáncer de próstata y un cáncer de próstata positivo para PSMA. El cáncer puede tener una expresión de antígenos no uniforme. El cáncer puede tener una expresión de antígenos modulada. El antígeno puede ser un antígeno de superficie. El cáncer puede no comprender un mieloma. El cáncer puede no comprender un melanoma. El cáncer puede no comprender un cáncer de colon. El cáncer puede ser leucemia linfoblástica aguda (ALL). El cáncer puede ser ALL con recidiva. El cáncer puede ser ALL refractaria. El cáncer puede ser ALL con recidiva, refractaria. El cáncer puede ser leucemia linfocítica crónica (CLL). El cáncer puede ser CLL con recidiva. El cáncer puede ser CLL refractaria. El cáncer puede ser CLL con recidiva, refractaria.

55 El cáncer puede comprender un cáncer de mama. El cáncer de mama puede ser cáncer de mama triple positivo (positivo para receptor de estrógenos, receptor de progesterona y Her2). El cáncer de mama puede ser cáncer de mama triple negativo (negativo para receptor de estrógenos, receptor de progesterona y Her2). El cáncer de mama puede ser positivo para receptor de estrógenos. El cáncer de mama puede ser negativo para receptor de estrógenos. El cáncer de mama puede ser positivo para receptor de progesterona. El cáncer de mama puede ser negativo para receptor de progesterona. El cáncer de mama puede comprender un cáncer de mama negativo para Her2. El cáncer de mama puede comprender un cáncer de mama con baja expresión de Her2. El cáncer de mama puede comprender un cáncer de mama positivo para Her2. Las líneas celulares que expresan Her2 se han caracterizado bien para la densidad de antígeno, reflejando la caracterización de la inmunohistoquímica clínica que clasifica los tumores malignos como 0 (<20.000 antígenos Her2 por célula), 1+ (100.000 antígenos Her2 por célula), 2+ (500.000 antígenos Her2 por célula) y 3+ (>2.000.00 antígenos Her2 por célula). La presente invención proporciona métodos de tratamiento de cánceres de mama de estas clasificaciones. El cáncer de mama puede comprender un cáncer de mama clasificado como Her2 0. El cáncer de mama puede comprender un cáncer de mama clasificado como Her2 1+. El cáncer de mama puede comprender un cáncer de mama clasificado como Her2 2+. El cáncer de mama puede comprender un cáncer de mama clasificado como Her2 3+.

La enfermedad o estado puede ser una infección patógena. Las infecciones patógenas pueden estar provocadas por uno o más patógenos. En algunos casos, el patógeno es una bacteria, hongos, virus o protozoo.

5 Los patógenos a modo de ejemplo incluyen pero no se limitan a: *Bordetella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Campylobacter*,
Chlamydia, *Chlamydophila*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Francisella*, *Haemophilus*,
Helicobacter, *Legionella*, *Leptospira*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*,
10 *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Vibrio* o *Yersinia*. En algunos casos, la enfermedad
o estado provocado por el patógeno es tuberculosis y la muestra heterogénea comprende moléculas foráneas
derivadas de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* y moléculas derivadas del sujeto. En algunos casos, la
enfermedad o estado está provocada por una bacteria que es tuberculosis, neumonía, que puede estar provocada por
bacterias tal como *Streptococcus* y *Pseudomonas*, una enfermedad transmitida por alimentos, que puede estar
provocada por bacterias tales como *Shigella*, *Campylobacter* y *Salmonella*, y una infección tal como tétanos, fiebre
15 tifoidea, difteria, sífilis y lepra. La enfermedad o estado puede ser vaginosis bacteriana, una enfermedad de la vagina
provocada por un desequilibrio de la flora bacteriana que se produce de manera natural. Alternativamente, la
enfermedad o estado es meningitis bacteriana, inflamación bacteriana de las meninges (por ejemplo, las membranas
protectoras que cubren el cerebro y la médula espinal). Otras enfermedades o estados provocados por bacterias
incluyen, pero no se limitan a, neumonía bacteriana, una infección del tracto urinario, gastroenteritis bacteriana e
infección bacteriana de la piel. Los ejemplos de infecciones bacterianas de la piel incluyen, pero no se limitan a,
20 impétigo que puede estar provocado por *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pyogenes*; erisipelas que pueden
estar provocadas por una infección bacteriana por estreptococos de la epidermis profunda con diseminación linfática;
y celulitis que puede estar provocada por la flora normal de la piel o por bacterias exógenas.

El patógeno puede ser un hongo, tal como, *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Pneumocystis* y
25 *Stachybotrys*. Los ejemplos de enfermedades o estados provocados por un hongo incluyen, pero no se limitan a, tiña
crural, infección por levaduras, dermatofitosis y pie de atleta.

El patógeno puede ser un virus. Los ejemplos de virus incluyen, pero no se limitan a, adenovirus, virus de coxsackie,
virus de Epstein-Barr, virus de la hepatitis (por ejemplo, hepatitis A, B y C), virus del herpes simple (tipo 1 y 2),
30 citomegalovirus, virus del herpes, VIH, virus influenza, virus del sarampión, virus de las paperas, papilomavirus, virus
parainfluenza, poliovirus, virus sincitial respiratorio, virus de la rubéola y virus de la varicela zóster. Los ejemplos de
enfermedades o estados provocados por virus incluyen, pero no se limitan a, resfriado, gripe, hepatitis, SIDA, viruela,
rubéola, paperas, sarampión, verrugas y poliomielitis.

El patógeno puede ser un protozoo, tal como *Acanthamoeba* (por ejemplo, *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*,
A. hatchetti, *A. polyphaga*, *A. rhysodes*, *A. healyi*, *A. divionensis*), *Brachiola* (por ejemplo, *B. connori*, *B. vesicularum*),
Cryptosporidium (por ejemplo, *C. parvum*), *Ciclospora* (por ejemplo, *C. cayetanensis*), *Encephalitozoon* (por ejemplo,
35 *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*), *Entamoeba* (por ejemplo, *E. histolytica*), *Enterocytozoon* (por ejemplo, *E.*
bieneusi), *Giardia* (por ejemplo, *G. lamblia*), *Isoospora* (por ejemplo, *I. belli*), *Microsporidium* (por ejemplo, *M. africanum*,
M. ceilonensis), *Naegleria* (por ejemplo, *N. fowleri*), *Nosema* (por ejemplo, *N. algerae*, *N. ocularum*), *Pleistophora*,
40 *Trachipleistophora* (por ejemplo, *T. anthropophthera*, *T. hominis*) y *Vittaforma* (por ejemplo, *V. corneae*).

La enfermedad o estado puede ser una enfermedad autoinmunitaria o enfermedad relacionada con autoinmunidad.
Un trastorno autoinmunitario puede ser un mal funcionamiento del sistema inmunitario del cuerpo que provoca que el
45 cuerpo ataque a sus propios tejidos. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias y enfermedades relacionadas
con autoinmunidad incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante,
síndrome antifosfolípidos (APS), anemia aplásica autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis
autoinmunitaria, miocarditis autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn,
dermatomiositis, fascitis eosinofílica, eritema nodoso, arteritis de células gigantes (arteritis temporal), síndrome de
50 Goodpasture, enfermedad de Graves, enfermedad de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP),
nefropatía de IgA, artritis juvenil, diabetes, diabetes juvenil, síndrome de Kawasaki, síndrome de Lambert-Eaton, lupus
(SLE), enfermedad de tejido conjuntivo mixto (MCTD), esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo, poliarteritis
nodosa, síndrome poliglandulares autoinmunitarios de tipo I, II y III, polimialgia reumática, polimiositis, psoriasis, artritis
psoriásica, síndrome de Reiter, policondritis recidivante, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de
55 Sjogren, autoinmunidad testicular y de esperma, síndrome del hombre rígido, arteritis de Takayasu, arteritis
temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

La enfermedad o estado puede ser una enfermedad inflamatoria. Los ejemplos de enfermedades inflamatorias
incluyen, pero no se limitan a, alveolitis, amiloidosis, angitis, espondilitis anquilosante, necrosis avascular, enfermedad
60 de Basedow, parálisis de Bell, bursitis, síndrome del túnel carpiano, enfermedad celiaca, colangitis, condromalacia
rotuliana, hepatitis crónica activa, síndrome de fatiga crónica, síndrome de Cogan, displasia congénita de cadera,
costocondritis, enfermedad de Crohn, fibrosis quística, tendinitis de De Quervain, artritis asociada a diabetes,
hiperostosis esquelética idiopática difusa, lupus discoide, síndrome de Ehlers-Danlos, fiebre mediterránea familiar,
fascitis, fibrositis/fibromialgia, hombro congelado, quistes ganglionares, arteritis de células gigantes, gota, enfermedad
65 de Graves, síndromes de enfermedades reumáticas asociadas al VIH, artritis asociada a hiperparatiroidismo, artritis
infecciosa, síndrome inflamatorio del intestino/síndrome del intestino irritable, artritis reumatoide juvenil, enfermedad

de Lyme, síndrome de Marfan, enfermedad de Mikulicz, enfermedad de tejido conjuntivo mixta, esclerosis múltiple, síndrome de dolor miofascial, osteoartritis, osteomalacia, osteoporosis y osteoporosis inducida por corticosteroides, enfermedad de Paget, reumatismo palindrómico, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Plummer, polimialgia reumática, polimiositis, pseudogota, artritis psoriásica, síndrome/fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, ciática (radiculopatía lumbar), esclerodermia, escorbuto, artritis de células falciformes, síndrome de Sjogren, estenosis espinal, espondiloistesis, enfermedad de Still, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Takayasu (sin pulso), tendinitis, codo de tenista/codo de golfista, artritis asociada al tiroides, dedo en resorte, colitis ulcerosa, granulomatosis de Wegener y enfermedad de Whipple.

Los métodos de tratamiento dados a conocer en el presente documento pueden comprender actividad fuera de diana tal como se mide mediante los niveles de citocina. El método puede reducir la actividad fuera de diana, tal como se mide mediante los niveles de citocina, en comparación con otras terapias con CAR-EC. El método puede reducir la actividad fuera de diana tal como se mide mediante los niveles de interferón gamma. Las otras actividades fuera de diana que pueden reducirse incluyen linfopenia tóxica, citólisis mortal de dianas de tumores sólidos e hipogammaglobulinemia crónica para dianas hematológicas. Los métodos de tratamiento y las composiciones dadas a conocer en el presente documento pueden usarse para tratar un cáncer que comprende aplasia de células B mediada por CD19. Los métodos y composiciones pueden minimizar la aplasia de células B mediada por CD19. El método puede evitar la aplasia de células B a largo plazo.

Las plataformas de CAR-EC, los métodos y las composiciones dados a conocer en el presente documento pueden usarse para tratar un tumor heterogéneo o un tumor maligno de células sanguíneas heterogéneo en un sujeto que lo necesita. El marcador de "todas las células B" CD20 es el antígeno seleccionado como diana más prevalentemente para neoplasias de células B y el anticuerpo aprobado por la FDA rituximab es un componente vital en el tratamiento de muchas leucemias y linfomas. Sin embargo, los mecanismos de resistencia relacionados con la modulación de la expresión de antígeno CD20 se produce en un número significativo de pacientes. Queda claro que el direccionamiento con antígeno o bien CD19 o bien CD20 solo es insuficiente para una terapia curativa. Los métodos dados a conocer en el presente documento proporcionan la construcción y administración de dos o más interruptores con diferentes especificidades (por ejemplo un interruptor de CAR-EC de anticuerpo anti-CD19 y un interruptor de CAR-EC de anticuerpo anti-CD20). Los métodos dados a conocer en el presente documento proporcionan la construcción y administración de dos o más interruptores con diferentes especificidades (por ejemplo un interruptor de CAR-EC de anticuerpo anti-CD19 y un interruptor de CAR-EC de anticuerpo anti-CD22). Un tumor heterogéneo o tumor maligno de células sanguíneas heterogéneo puede tratarse con un primer interruptor de CAR-EC de anticuerpo y un segundo interruptor de CAR-EC de anticuerpo, en el que el interruptor de CAR-EC se une a dos dianas diferentes. Uno o más interruptores de CAR-EC pueden administrarse secuencial o simultáneamente.

El interruptor de CAR-EC puede administrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales. El uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden seleccionarse de un grupo que consiste en una inmunoterapia, una quimioterapia y un esteroide. El uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden ser un fármaco quimioterápico. El fármaco quimioterápico puede ser un agente alquilante, un antimetabolito, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa, un inhibidor mitótico, un corticosteroide o un agente de diferenciación. El fármaco quimioterápico puede seleccionarse de actinomicina-D, bleomicina, altretamina, bortezomib, busulfano, carboplatino, capecitabina, carmustina, clorambucilo, cisplatino, cladribina, clofarabina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, daunorubicina, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, etopósido, estramustina, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina (Gemzar), hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecán (Camptosar), ixabepilona, L-asparaginasa, lomustina, mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitomicina-C, paclitaxel (Taxol), pemetrexed, pentostatina, estreptozocina, temozolomida, tenipósido, tioguanina, tiotepa, topotecán (Hycamtin), vincristina, vinblastina, vinorelbina, retinoides, tretinoína (ATRA o Atralin[®]), bexaroteno (Targetin[®]) y trióxido arsénico (Arsenox[®]). La quimioterapia puede administrarse como una píldora para tragar, como una inyección en tejido muscular o graso, por vía intravenosa, por vía tópica o directamente a una cavidad corporal.

El uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden comprender un inhibidor de la angiogénesis. El inhibidor de la angiogénesis puede seleccionarse de bevacizumab, itraconazol, carboxiamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN alfa, IL-12, factor plaquetario 4, suramina, SU5416, trombospondina, un antagonista de VEGFR, un esteroide angiostático con heparina, factor inhibidor de la angiogénesis derivado de CAR-ECilage, inhibidores de metaloproteasa de la matriz, angiostatina, endostatina, sorafenib, sunitinib, pazopanib, everolimus, 2-metoxiestradiol, tecogalán, tetratiomolibdato, talidomida, prolactina, inhibidor de $\alpha v \beta_3$, linomida, tasquinimod, VEGFR-1 soluble, NRP-1 soluble, angiopoyetina 2, vasostatina, calreticulina, TIMP, CDAI, Met-1, Met-2, interferón-alfa, interferón-beta, interferón-gamma, CXCL10, IL-4, IL-12, IL-18, protrombina, fragmento de antitrombina III, prolactina, VEGI, SPARC, osteopontina, maspina, canstatina, proteína relacionada con proliferina y restina.

El uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden comprender una terapia hormonal. La terapia hormonal puede seleccionarse de un antiestrógeno (por ejemplo, fulvestrant (Faslodex[®]), tamoxifeno, toremifeno (Fareston[®])); un inhibidor de aromatasa (por ejemplo, anastrozol (Arimidex[®]), exemestano (Aromasin[®]), letrozol (Femara[®])); una progestina (por ejemplo, acetato de megestrol (Megace[®])); un estrógeno; un antiandrógeno (por ejemplo, bicalutamida (Casodex[®]), flutamida (Eulexin[®]), nilutamida (Nilandron[®])); un agonista o análogo de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) u hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) (por ejemplo leuprolida, (Lupron[®]),

goserelina (Zoladex®)).

El uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden comprender un esteroide. El esteroide puede ser un corticosteroide. El esteroide puede ser cortisol o un derivado del mismo. El esteroide puede seleccionarse de prednisona, metilprednisolona (Solumedrol®) o dexametasona.

El interruptor de CAR-EC puede administrarse con una o más terapias adicionales. La una o más terapias adicionales pueden comprender terapia con láser. La una o más terapias adicionales pueden comprender radioterapia. La una o más terapias adicionales pueden comprender cirugía.

Reguladores de CAR-EC

En algunos casos, puede ser deseable eliminar las células efectoras con receptores de antígenos quiméricos (CAR-EC) inactivas de un sujeto o regular por disminución la expresión del receptor de antígeno quimérico (CAR) mediante la CAR-EC. Por ejemplo, un CAR-EC puede provocar una respuesta inmunitaria a partir del sujeto y puede ser deseable regular por disminución la expresión del CAR para eliminar la respuesta inmunitaria. Alternativamente, puede ser deseable desencadenar la muerte celular de la CAR-EC. Se dan a conocer en el presente documento métodos de regulación de las CAR-EC en un sujeto, comprendiendo el método administrar un regulador de CAR-EC. A diferencia de los interruptores dados a conocer en el presente documento que activan la CAR-EC y dirigen la actividad de la CAR-EC a una diana, el regulador de CAR-EC puede interactuar con una molécula de superficie en una CAR-EC para inducir la regulación por disminución de la expresión del CAR o inducir la muerte celular programada de la CAR-EC. La CAR-EC puede comprender un polinucleótido que codifica para el CAR. La expresión del CAR puede controlarse mediante un promotor. El promotor puede ser un promotor regulable. Por ejemplo, expresión del CAR puede controlarse mediante un promotor Tet. En ausencia de tetraciclina o un derivado de la misma (por ejemplo, doxiciclina), la CAR-EC puede expresar el CAR. En presencia de tetraciclina o derivado de la misma, la expresión del CAR se inhibe. Por tanto, el regulador de CAR-EC puede comprender una molécula (por ejemplo, tetraciclina, doxiciclina) que inhibe la expresión del CAR. La expresión del CAR puede controlarse mediante un sistema regulable quimérico. El regulador de CAR-EC puede comprender un transactivador que puede interactuar con secuencias específicas que se han modificado por ingeniería genética para dar el polinucleótido que codifica para el CAR. Los sistemas quiméricos pueden regularse mediante tetraciclina, antagonista de progesterona RU486, hormona de insectos ecdisona o rapamicina (FK506). Estos fármacos u hormonas (o sus análogos) pueden actuar sobre transactivadores moduladores compuestos por dominios de unión a ligando naturales o mutantes y dominios de activación transcripcional y de unión a ADN intrínsecos y extrínsecos. (Agha-Mohammadi y Lotze, *Regulatable systems: applications in gene therapy and replicating viruses*, J Clin Invest., 105(9):1177-1183, 2000).

El regulador de CAR-EC puede comprender una molécula que interactúa con el CAR de la CAR-EC. El regulador de CAR-EC puede competir con el interruptor de CAR-EC por el CAR en la CAR-EC. El regulador de CAR-EC puede comprender una molécula pequeña. El regulador de CAR-EC puede comprender un péptido. El péptido puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

El regulador de CAR-EC puede comprender además un fármaco o una toxina. El fármaco o la toxina puede conjugarse con la porción del regulador de CAR-EC que interactúa con el CAR de la CAR-EC. El fármaco o la toxina puede seleccionarse de maitansina (por ejemplo, DM1, DM4), monometilauristatina E, monometilauristatina F, Ki-4.dgA, dolastatina 10, caliqueamicina, SN-38, duocarmicina, irinotecán, ricina, saporina, gelonina, proteína antiviral de fitolaca, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* o toxina diftérica. La toxina puede comprender un veneno, una toxina bacteriana (por ejemplo, toxinas bacterianas que provocan tétanos, difteria), una toxina vegetal o toxina animal. La toxina puede ser un veneno de serpiente. La toxina puede comprender vinblastina. La toxina puede comprender auristatina. La toxina puede estar contenida en una vesícula recubierta con membrana de liposomas. El anticuerpo puede unirse a la vesícula recubierta con membrana de liposomas.

Las figuras 17A-C muestran esquemas de interacciones de regulador de CAR-CAR-EC a modo de ejemplo. Tal como se muestra en la figura 17A, una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) (1701) puede comprender un receptor de antígeno quimérico (1704) y una molécula coestimuladora (1720). El CAR (1704) puede comprender un dominio externo (1715), un dominio transmembrana (1710) y un dominio interno (1705). El regulador de CAR-EC (1725) puede interactuar con el dominio externo (1715) del CAR (1704). La unión del regulador de CAR-EC (1725) al CAR (1704) puede inducir apoptosis de CAR-EC. La unión del regulador de CAR-EC (1725) al CAR (1704) puede inducir muerte celular inducida por activación de CAR-EC. La unión del regulador de CAR-EC (1725) al CAR (1704) puede inducir autofagia de CAR-EC. La unión del regulador de CAR-EC (1725) al CAR (1704) puede inducir regulación por disminución del CAR. La unión del regulador de CAR-EC (1725) al CAR (1704) puede impedir que el interruptor de CAR-EC se una al CAR.

Tal como se muestra en la figura 17B, una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) (1730) puede comprender un receptor de antígeno quimérico (CAR) (1731), una molécula coestimuladora (1750) y una molécula de superficie (1755). El CAR (1731) puede comprender un dominio externo (1745), un dominio transmembrana (1740) y un dominio interno (1735). El regulador de CAR-EC (1760) puede comprender un primer extremo (1765) que interactúa con el dominio externo (1715) del CAR (1731) y un segundo extremo (1770) que interactúa con la

molécula de superficie (1755) en la CAR-EC. La unión de un extremo del regulador de CAR-EC (1760) al CAR (1731) y la molécula de superficie (1755) de la CAR-EC (1730) puede inducir la apoptosis de CAR-EC. La unión de un extremo del regulador de CAR-EC (1760) al CAR (1731) y la molécula de superficie (1755) de la CAR-EC (1730) puede inducir muerte celular inducida por activación de CAR-EC. La unión de un extremo del regulador de CAR-EC (1760) al CAR (1731) y la molécula de superficie (1755) de la CAR-EC (1730) puede inducir autofagia de CAR-EC. La unión de un extremo del regulador de CAR-EC (1760) al CAR (1731) y la molécula de superficie (1755) de la CAR-EC (1730) puede inducir regulación por disminución del CAR. La unión de un extremo del regulador de CAR-EC (1765) al CAR (1731) puede impedir que el interruptor de CAR-EC se una al CAR.

Tal como se muestra en la figura 17C, una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) (1775) puede comprender un receptor de antígeno quimérico (1774) y una molécula coestimuladora (1779). El CAR (1774) puede comprender un dominio externo (1778), un dominio transmembrana (1777) y un dominio interno (1776). El regulador de CAR-EC (1780) puede comprender una primera región (1781) que interacciona con el dominio externo (1778) del CAR (1774) en la célula efectora. El regulador de CAR-EC (1780) puede comprender además una segunda región (1782) que interacciona con una molécula de superficie (1791) en otra célula (1790). La célula (1790) puede secretar citocinas u otras moléculas que pueden interaccionar con la CAR-EC. La interacción de las citocinas u otras moléculas con la CAR-EC puede inducir apoptosis de CAR-EC. La interacción de las citocinas u otras moléculas con la CAR-EC puede inducir muerte celular inducida por activación de CAR-EC. La interacción de las citocinas u otras moléculas con la CAR-EC puede inducir autofagia de CAR-EC. La interacción de las citocinas u otras moléculas con la CAR-EC puede inducir regulación por disminución del CAR. La unión de un extremo del regulador de CAR-EC (1781) al CAR (1774) puede impedir que el interruptor de CAR-EC se una al CAR.

La CAR-EC puede comprender una célula efectora que se modifica para expresar una molécula de superficie que puede interaccionar con el regulador de CAR-EC. La molécula de superficie en la CAR-EC puede ser una proteína viral o fragmento de la misma. Alternativa o adicionalmente, la célula efectora expresa una proteína viral o fragmento de la misma que no es un marcador de superficie celular. La célula efectora que expresa una proteína viral o fragmento de la misma puede seleccionarse como diana con un fármaco. Cuando la célula efectora comprende una proteína viral o fragmento de la misma, el fármaco puede seleccionarse de un grupo que comprende abacavir, aciclovir, adefovir, amantadina, amprenavir, amprigen, arbidol, atazanavir, atripla, balavir, boceprevir, cidofovir, combivir, darunavir, delavirdina, didanosina, docosanol, edoxudina, efavirenz, emtricitabina, enfuvirtida, entecavir, un inhibidor de la entrada, famciclovir, una combinación de dosis fija de fármaco antirretroviral, fomivirsén, fosamprenavir, foscarnet, fosfonet, un inhibidor de la fusión, ganciclovir, ibacitabina, imunovir, idoxuridina, imiquimod, indinavir, inosina, inhibidor de integrasa, interferón tipo III, interferón tipo II, interferón tipo I, interferón, lamivudina, lopinavir, lovirodina, maraviroc, moroxidina, metisazona, nelfinavir, nevirapina, nexavir, análogo de nucleósido, oseltamivir, peginterferón alfa-2a, penciclovir, peramivir, pleconaril, podofilotoxina, inhibidor de proteasa, raltegravir, un inhibidor de transcriptasa inversa, ribavirina, rimantadina, ritonavir, piramidina, saquinavir, sofosbuvir, estavudina, un fármaco retroviral potenciador sinérgico, aceite de árbol del té, telaprevir, tenofovir, tenofovir disoproxil, tipranavir, trifluridina, trizivir, tromantadina, truvada, valaciclovir, vicriviroc, vidarabina, viramidina, zalcitabina, zanamivir o zidovudina. El fármaco puede ser ganciclovir. El fármaco puede ser aciclovir.

Composiciones farmacéuticas

Los interruptores, productos intermedios de interruptores y CAR-EC dados a conocer en el presente documento pueden usarse en la formulación de una o más composiciones. Las composiciones pueden ser composiciones farmacéuticas. Las composiciones que comprenden uno o más interruptores, productos intermedios de interruptores y/o CAR-EC pueden comprender además una o más sales, excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Las sales, excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, portadores, excipientes, diluyentes, antioxidantes, conservantes, agentes colorantes, aromatizantes y diluyentes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, cargas, agentes de carga, tampones, vehículos de administración, agentes de tonicidad, codisolventes, agentes humectantes, agentes complejantes, agentes tamponantes, antimicrobianos y tensioactivos. Solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica son portadores apropiados a modo de ejemplo.

Las composiciones pueden incluir antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o surfactantes no iónicos tales como Tween, pluronics o polietilenglicol (PEG). También a modo de ejemplo, los agentes potenciadores de la tonicidad adecuados incluyen haluros de metales alcalinos (preferiblemente cloruro de sodio o potasio), manitol, sorbitol y similares. Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y similares. El peróxido de hidrógeno también puede utilizarse como conservante. Los codisolventes adecuados incluyen glicerina, propilenglicol y PEG. Los agentes complejantes adecuados incluyen cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Los agentes tensioactivos o humectantes adecuados incluyen ésteres de sorbitano, polisorbatos tales como polisorbato 80, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal y similares. Los tampones pueden ser tampones convencionales tales como acetato, borato,

citrato, fosfato, bicarbonato o Tris-HCl. El tampón acetato puede tener un pH de aproximadamente 4-5,5, y el tampón Tris puede tener un pH de aproximadamente 7-8,5. Agentes farmacéuticos adicionales se exponen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. R. Gennaro, editor, Mack Publishing Company, 1990.

5 La composición puede estar en forma líquida, liofilizada o secada por congelación. La composición puede incluir uno o más lioprotectores, excipientes, tensioactivos, aditivos estructurales de alto peso molecular y/o agentes de carga (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.685.940, 6.566.329 y 6.372.716). En una realización, se incluye un lioprotector, que es un azúcar no reductor tal como sacarosa, lactosa o trehalosa. La cantidad de lioprotector generalmente incluida es tal que, después de la reconstitución, la formulación resultante será isotónica, aunque también pueden ser adecuadas formulaciones hipertónicas o ligeramente hipotónicas. Además, la cantidad de lioprotector debe ser suficiente para prevenir una cantidad inaceptable de degradación y/o agregación de la proteína tras la liofilización. Concentraciones de lioprotector a modo de ejemplo para azúcares (por ejemplo, sacarosa, lactosa, trehalosa) en la formulación prelioofilizada son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM. En otra realización, se incluye un tensioactivo, tal como, por ejemplo, tensioactivos no iónicos y tensioactivos iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); éteres de fenilo de poli(etilenglicol) (por ejemplo, Triton); dodecilsulfato de sodio (SDS); laurelsulfato de sodio; octilglicósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaína; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil, miristil o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isostearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo); miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestramidilpropil-dimetilamina; metilcooil sódico o metil-ofeil-taurato de disodio; y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), polietilglicol, polipropilglicol y copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo, Pluronic, pf68, etc.). Cantidades a modo de ejemplo de tensioactivo que pueden estar presentes en la formulación prelioofilizada son de aproximadamente el 0,001-0,5%. Aditivos estructurales de alto peso molecular (por ejemplo, cargas, aglutinantes) pueden incluir, por ejemplo, goma arábiga, albúmina, ácido alginico, fosfato de calcio (dibásico), celulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina, dextrano, dextrina, dextratos, sacarosa, tilosa, almidón pregelatinizado, sulfato de calcio, amilosa, glicina, bentonita, maltosa, sorbitol, etilcelulosa, hidrogenofosfato de disodio, fosfato de disodio, piro-sulfito de disodio, poli(alcohol vinílico), gelatina, glucosa, goma guar, glucosa líquida, azúcar comprimible, silicato de aluminio y magnesio, maltodextrina, poli(óxido de etileno), polimetacrilatos, povidona, alginato de sodio, tragacanto, celulosa microcristalina, almidón y zeína. Las concentraciones a modo de ejemplo de aditivos estructurales de alto peso molecular son del 0,1% al 10% en peso. En otras realizaciones, puede incluirse un agente de carga (por ejemplo, manitol, glicina).

35 Las composiciones pueden ser adecuadas para administración parenteral. Composiciones a modo de ejemplo son adecuadas para inyección o infusión en un animal por cualquier vía disponible para el experto en la técnica, tales como vías intraarticular, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosa), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional. Una formulación parenteral típicamente será una disolución acuosa isotónica estéril, libre de pirógenos, que contiene opcionalmente conservantes farmacéuticamente aceptables.

40 Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones alcoholicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de líquidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos, tales como los que se basan en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, gases inertes y similares. Véase, en general, Remington's Pharmaceutical Science, 16ª edición, Mack Eds., 1980.

50 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden formularse para administración controlada o sostenida de una manera que proporcione la concentración local del producto (por ejemplo, bolo, efecto de depósito) y/o mayor estabilidad o vida media en un entorno local particular. Las composiciones pueden comprender la formulación de interruptores, polipéptidos, ácidos nucleicos o vectores de CAR-EC dados a conocer en el presente documento con preparaciones particuladas de compuestos poliméricos tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), etc., así como agentes tales como una matriz biodegradable, microesferas inyectables, partículas microcapsulares, microcápsulas, perlas de partículas bioerosionables, liposomas y dispositivos de administración implantables que proporcionan la liberación controlada o sostenida del agente activo que entonces puede administrarse como una inyección de depósito. Se conocen técnicas para formular tales medios de administración sostenida o controlada y se han desarrollado y usado una variedad de polímeros para la liberación y la administración controlada de fármacos. Tales polímeros son normalmente biodegradables y biocompatibles. Los hidrogeles de polímeros, incluidos los formados por la complejación de segmentos de polipéptidos o polímeros enantioméricos, y los hidrogeles con propiedades sensibles a la temperatura o al pH, pueden ser deseables para proporcionar un efecto de depósito de fármacos debido a las condiciones suaves y acuosas implicadas en el atrapamiento de agentes de proteínas bioactivas (por ejemplo, anticuerpos que comprenden una CDR3 ultralarga). Véase, por ejemplo, la descripción de micropartículas poliméricas porosas de liberación controlada para la administración de composiciones farmacéuticas en el documento WO 93/15722. Los materiales adecuados para este propósito incluyen polilactidas

(véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 3.773.919), polímeros de poli(ácidos α -hidroxicarboxílicos), tales como ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988A), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)), poli(2-hidroxietilmetacrilato) (Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 (1981) y Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)), etileno-acetato de vinilo o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Otros polímeros biodegradables incluyen poli(lactonas), poli(acetales), poli(ortoésteres) y poli(ortocarbonatos). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que pueden prepararse por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Eppstein *et al.*, *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 82: 3688-92 (1985)). El propio portador, o sus productos de degradación, no deben ser tóxicos en el tejido diana y no deben agravar aún más la enfermedad. Esto puede determinarse mediante el examen rutinario en modelos animales del trastorno objetivo o, si tales modelos no están disponibles, en animales normales. La microencapsulación de proteínas recombinantes para la liberación sostenida se ha realizado con éxito con hormona del crecimiento humana (rhGH), interferón (rhIFN-), interleucina-2 y MN rgp120. Johnson *et al.*, *Nat. Med.*, 2: 795-799 (1996); Yasuda, *Biomed. Ther.*, 27: 1221-1223 (1993); Hora *et al.*, *Bio/Technology*, 8: 755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Poly(lactide Polyglycolide Microsphere Systems)", en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell and Newman, eds. (Plenum Press: Nueva York, 1995), págs. 439-462; los documentos WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; y la patente estadounidense n.º 5.654.010. Las formulaciones de liberación sostenida de estas proteínas se desarrollaron usando un polímero de poli-ácido-láctico-coglicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y su amplio rango de propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, ácidos láctico y glicólico pueden aclararse rápidamente dentro del cuerpo humano. Además, la degradabilidad de este polímero puede depender de su peso molecular y composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", en: M. Chasin y R. Langer (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker: Nueva York, 1990), págs. 1-41. Los ejemplos adicionales de composiciones de liberación sostenida incluyen, por ejemplo, el documento EP 58.481A, la patente estadounidense n.º 3.887.699 el documento P 158.277A, la patente canadiense n.º 1176565, U. Sidman *et al.*, *Biopolymers* 22, 547 [1983], R. Langer *et al.*, *Chem. Technology* 12, 98 [1982], Sinha *et al.*, *J. Control. Publication* 90, 261 [2003], Zhu *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 18, 24 [2000] y Dai *et al.*, *Colloids Surf B Biointerfaces* 41, 117 [2005].

También se contemplan polímeros bioadhesivos para uso en o con composiciones de la presente divulgación. Los bioadhesivos son materiales sintéticos y que se producen de manera natural que pueden adherirse a sustratos biológicos durante períodos de tiempo prolongados. Por ejemplo, Carbopol y policarbofilo son ambos derivados sintéticos reticulados de poli(ácido acrílico). Los sistemas de administración de bioadhesivos basados en sustancias que se producen de manera natural incluyen, por ejemplo, ácido hialurónico, también conocido como hialuronano. El ácido hialurónico es un mucopolisacárido que se produce de manera natural que consiste en residuos de D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. El ácido hialurónico se encuentra en la matriz de tejido extracelular de los vertebrados, incluyendo en tejidos conjuntivos, así como en el líquido sinovial y en el humor vítreo y acuoso del ojo. Se han usado derivados esterificados de ácido hialurónico para producir microesferas para uso en administración que son biocompatibles y biodegradables (véanse, por ejemplo, Cortivo *et al.*, *Biomaterials* (1991) 12: 727-730; documentos EP 517.565; WO 96/29998; Illum *et al.*, *J. Controlled Rel.* (1994) 29: 133-141).

Pueden usarse matrices poliméricas tanto biodegradables como no biodegradables para administrar las composiciones de la presente divulgación, y tales matrices poliméricas pueden comprender polímeros naturales o sintéticos. Se prefieren las matrices biodegradables. El período de tiempo durante el cual se produce la liberación se basa en la selección del polímero. Normalmente, la liberación durante un período que oscila entre unas pocas horas y de tres a doce meses es lo más deseable. Los polímeros sintéticos a modo de ejemplo que pueden usarse para formar el sistema de administración biodegradable incluyen: polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polialquilenglicoles, poli(óxidos de alquileno), poli(tereftalatos de alquileno), poli(alcoholes vinílicos), polivinil éteres, poli(ésteres vinílicos), poli(haluros de vinilo), polivinilpirrolidona, poliglicolidas, polisiloxanos, polianhídridos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, poli(ácido bórico), poli(ácido valérico), alquilcelulosa, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, polímeros ésteres acrílicos y metacrílicos, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato-butilato de celulosa, ftalato-acetato de celulosa, carboxietilcelulosa, triacetato de celulosa, sal de sodio de sulfato de celulosa, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo), polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(alcoholes vinílicos), poli(acetato de vinilo), poli(cloruro de vinilo), poliestireno y polivinilpirrolidona. Los polímeros naturales a modo de ejemplo incluyen alginato y otros polisacáridos incluyendo dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquileno, hidroxilaciones, oxidaciones y otras modificaciones hechas rutinariamente por los expertos en la técnica), albúmina y otras proteínas hidrófilas, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrófobas, copolímeros y mezclas de los mismos. En general, estos materiales se degradan o bien por hidrólisis enzimática o bien por exposición al agua *in vivo*, por erosión superficial o masiva. El polímero está opcionalmente en forma de un hidrogel (véanse, por ejemplo, los documentos WO 04/009664, WO 05/087201, Sawhney, *et al.*, *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587) que puede absorber hasta aproximadamente el 90% de su peso en agua y además opcionalmente está reticulado con iones multivalentes u otros polímeros.

Los sistemas de administración también incluyen sistemas no poliméricos que son lípidos incluyendo esteroides, tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-di y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera; comprimidos fabricados por compresión utilizando aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fundidos; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas de erosión en los que el producto está contenido en una forma dentro de una matriz tales como las que se describen en las patentes estadounidenses n.ºs 4.452.775, 4.675.189 y 5.736.152 y (b) sistemas de difusión en los cuales un producto permea a una velocidad controlada desde un polímero tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Los liposomas que contienen el producto pueden prepararse por métodos conocidos, tales como por ejemplo (documentos DE 3.218.121; Epstein *et al.*, Proc. Natl Acad Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl Acad Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980); documentos EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; JP 83-118008; patentes estadounidense n.ºs 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP 102.324).

Alternativa o adicionalmente, las composiciones pueden administrarse localmente por medio de implantación en el área afectada de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el cual se ha absorbido o encapsulado un interruptor de CAR-EC dado a conocer en el presente documento. Cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de un interruptor, ácido nucleico o vector de CAR-EC dado a conocer en el presente documento puede realizarse directamente a través del dispositivo por medio de un bolo, o por medio de administración continua, o por medio de catéter mediante infusión continua.

Una composición farmacéutica que comprende un interruptor de CAR-EC dado a conocer en el presente documento puede formularse para inhalación, tal como, por ejemplo, como un polvo seco. Las disoluciones de inhalación también pueden formularse en un propelente licuado para la administración de aerosol. En aún otra formulación, las disoluciones pueden nebulizarse. Las composiciones farmacéuticas adicionales para administración pulmonar incluyen las descritas, por ejemplo, en el documento WO 94/20069, que da a conocer la administración pulmonar de proteínas modificadas químicamente. Para la administración pulmonar, el tamaño de partícula debe ser adecuado para la administración al pulmón distal. Por ejemplo, el tamaño de partícula puede ser de desde 1 µm hasta 5 µm; sin embargo, pueden usarse partículas más grandes, por ejemplo, si cada partícula es bastante porosa.

Determinadas formulaciones que contienen los interruptores de CAR-EC dados a conocer en el presente documento pueden administrarse por vía oral. Las formulaciones administradas de esta manera pueden formularse con o sin los portadores utilizados habitualmente en la composición de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, una cápsula puede diseñarse para liberar la porción activa de la formulación en el punto del tubo gastrointestinal cuando la biodisponibilidad se maximiza y la degradación presistémica se minimiza. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción de un agente de unión selectiva. También pueden emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de disgregación de comprimidos y aglutinantes.

Otra preparación puede implicar una cantidad eficaz de un interruptor CAR-EC dado a conocer en el presente documento en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Al disolver los comprimidos en agua estéril u otro vehículo apropiado, las disoluciones pueden prepararse en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa o fosfato de calcio; o agentes de unión, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas y/o preferidas pueden determinarse en vista de la presente divulgación y el conocimiento general de la tecnología de formulación, dependiendo de la vía de administración, el formato de administración y la dosis previstos. Independientemente de la forma de administración, una dosis eficaz puede calcularse según el peso corporal del paciente, el área de superficie corporal o el tamaño del órgano. El refinamiento adicional de los cálculos para determinar la dosificación apropiada para el tratamiento que implica cada una de las formulaciones descritas en el presente documento se realiza de manera rutinaria en la técnica y se encuentra dentro del ámbito de las tareas que se realizan de manera rutinaria en la técnica. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse mediante el uso de datos de dosis-respuesta apropiados.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustrativos son representativos de realizaciones de las aplicaciones, sistemas y métodos descritos en el presente documento y no se pretende que sean limitativos de ningún modo.

Ejemplo 1 - Citotoxicidad de una plataforma de interruptor de CAR-T de anticuerpo anti-CD19-FITC unido de manera específica de sitio

Se subclonaron los scFv anti-FITC 4-4-20 (4-4-20), 4D5Flu (4D5Flu), 4M5,3 (4M5.3) y FITC-E2 (FITC-E2) (tabla 1) en un vector lentiviral que contenía un CAR de segunda generación (desde el extremo C-terminal: CD3ζ, 4-1BB, dominio transmembrana CD8, FITC scFv). Se transdujeron células T con el vector lentiviral resultante.

Tabla 1. FITC Anticuerpos de FITC

scFv	Armazón	Kd	Notas
4-4-20	Murino	0,23 nM	Generado a partir de hibridoma de ratón, y madurado mediante trasplante de regiones de entramado e intercambio de ADN propenso a errores
4D5Flu	Quimérico	22 nM	CDR de 4-4-20 trasplantadas a la región de entramado humana de 4D5
4M5.3	Murino	0,3 pM	4-4-20 mutagenizado mediante intercambio de ADN propenso a errores: afinidad extremadamente alta
FITC-E2	Humano	0,3 nM	Seleccionado mediante presentación en fago a partir de una biblioteca de scFv humanos sin tratamiento previo

5 Se logró la producción del interruptor de CAR-T usando modificación específica de sitio de un Fab anti-CD19 con el aminoácido no natural *p*-acetilfenilalanina (*p*AcF). *p*AcF se incorporó en dos sitios independientes (cadena pesada, HC K136; o cadena ligera, LC S202, figura 2A) distales a la interfaz de unión del Fab anti-CD 19. La cetona de *p*AcF se usó entonces como asa química para modificar el Fab de manera específica de sitio con un ligador de azida-PEG-aminooxilo (N₃-TEG-ONH₂) heterobifuncional por medio de ligación de oxima (figura 2B). La ligación de oxima es altamente estable en condiciones fisiológicas. Un FITC modificado con un ligador de PEG-ciclooctino se unieron mediante química “click” a la proteína a través de una reacción de cicloadición [3+2].

15 Para evaluar la actividad y la especificidad de la plataforma de CAR-T conmutable, se sometió a ensayo la citotoxicidad de células efectoras humanas transducidas con lentivirus que albergan uno de los cuatro receptores de antígenos quiméricos basados en FITC (las eficiencias de transducción fueron del 40-60%). La actividad citotóxica de los CAR-T dependía del interruptor de FITC anti-CD 19 contra células de mieloma múltiple positivas para CD19 (IM-9, CE₅₀ = 3-12 pM) y células de leucemia linfoblástica aguda (LLA) positivas para CD19 (RS4; 11), mientras que tienen una actividad muy baja contra células negativas para CD19 (K526, CE₅₀ n.d.) (figuras 3A-B), (tabla 2). Inesperadamente, la citólisis era independiente de la afinidad de scFv FITC en estos ensayos. Estos resultados fueron reproducibles contra linfoma de Burkitt positivo para CD19 (Daudi) y células IM-9 positivas para CD-19. Notablemente, los resultados indican que el interruptor producido por medio de conjugación aleatoria de FITC anti-CD19 (razón de FITC con respecto a anticuerpo promedio = 2:1) fue menos eficaz que los interruptores creados mediante conjugación específica de sitio con cualquiera de LC S202*p*AcF, HC K136*p*AcF, o ambos (figura 3C). Además, los interruptores conjugados de manera no específica condujeron a una mayor citólisis de fondo de células K562 negativas para CD19 (que los interruptores conjugados de manera específica de sitio) a concentraciones de 1 nM o más. Los interruptores conjugados de manera no específica también demostraron variabilidad de lotes en los ensayos de citotoxicidad. Por tanto, los interruptores específicos de sitio han demostrado una mayor eficacia y una menos efectos fuera de diana en los resultados preliminares, alentando su investigación adicional.

30 Ensayo de citotoxicidad

35 Se incubaron conjuntamente células efectoras humanas transducidas (~ 50% de eficiencia de transducción) con células diana a una razón de 10:1 (células T totales con respecto a células diana) durante 24 horas en presencia de concentraciones variables de “interruptores” de FITC. La lisis redirigida de las células diana se determinó mediante el kit de ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox96 (Promega, Madison, WI) según el protocolo del fabricante. El porcentaje de citotoxicidad se calculó mediante: % de citotoxicidad = (absorbancia experimental promedio - absorbancia espontánea promedio) / (absorbancia de destrucción máxima promedio - absorbancia espontánea promedio) x 100.

40 Tabla 2.

RS4;11	% de citotoxicidad			
Concentración (pM)	4-4-20	4D5Flu	4M5.3	FITC-E2
1	4,736842	6,952663	7,608696	15,92837
10	15,89474	20,46351	33,69565	36,19227
100	37,68421	39,00394	53,36439	51,46088
1000	45,05263	51,13412	62,57764	54,38266
10000	43,78947	53,59961	65,68323	55,04241
IM-9	% de citotoxicidad			
Concentración (pM)	4-4-20	4D5Flu	4M5.3	FITC-E2
1	0	0	16,92913	6,829268
10	43,08943	68,19923	60,62992	65,36585
100	77,64227	73,18008	88,97638	68,78049

1000	69,51219	77,0115	87,00787	86,82927
10000	63,00813	75,09579	79,52756	81,95122
K562	% de citotoxicidad			
Concentración (pM)	4-4-20	4D5Flu	4M5.3	FITC-E2
1	5,214724	0	0,3948667	0
10	0	0	1,48075	0
100	0,9202454	0	4,047384	0
1000	1,533742	0	0	17,75599
10000	13,59918	30,28105	13,6229	15,35948

Ejemplo 2 - Citotoxicidad de un interruptor de CAR-T de anticuerpo anti-Her2-FITC ligado de manera específica de sitio

- 5 Se sometió a ensayo la actividad de CAR-T contra células de cáncer de mama positivas para Her2 SKBR3 usando un interruptor anti-Her2 basado en el anticuerpo trastuzumab (Herceptin). El interruptor de Fab se conjugó aleatoriamente o se conjugó en LC S202pAcF con FITC de manera similar al interruptor de CAR-T de anticuerpo anti-CD 19-FITC que se conjugó aleatoriamente. Los resultados demuestran que este interruptor de CAR-T de anticuerpo anti-Her2-FITC con FITC conjugado en LC S202pAcF era eficaz en el control de la actividad contra células positivas para Her2 (CE₅₀ = 8-20 nM) (figura 3D, tabla 3). Los interruptores no conjugados específicamente también demostraron variabilidad de lotes en ensayos de citotoxicidad.

Tabla 3. Actividad de interruptor de FITC mediante el método de conjugación

SKBR3		% de citotoxicidad			
Concentración (pM)	aHer2 met azida	aHer2 wt NHS (0,5)	aHer2 wt NHS (1)	aHer2 wt iso (0,5)	aHer2 wt iso (1)
0,01	1,973684	0,5695688	1,72117	0,5967605	3,948577
0,1	9,12966	14,533	7,825433	0,0372995	0
1	41,97158	60,69239	24,68021	27,04215	0
10	77,65542	73,0256	60,19564	72,69675	35,50652
100	87,67318	84,06059	78,85629	75,53152	54,46339
1000	95,7016	85,28669	92,85177	89,10854	72,81846
10000	91,08348	87,23404	91,94884	83,28982	74,42327
MDA MB231		% de citotoxicidad			
Concentración (pM)	aHer2 met azida	aHer2 wt NHS (0,5)	aHer2 wt NHS (1)	aHer2 wt iso (0,5)	aHer2 wt iso (1)
0,01	0	3,824247	1,72117	0,5967605	3,948577
0,1	0	0	0	0	0
1	0,4157044	0	0	0	0
10	9,745958	0	0,877193	3,500691	0
100	47,99076	34,01163	36,88828	39,88945	20,78413
1000	48,72979	46,89922	46,49123	45,87748	37,12801
10000	45,86605	43,70155	43,53647	41,08706	36,65564
MDA MB468		% de citotoxicidad			
Concentración (pM)	aHer2 met azida	aHer2 wt NHS (0,5)	aHer2 wt NHS (1)	aHer2 wt iso (0,5)	aHer2 wt iso (1)
0,01	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0,6703911	0	0
1	-5,84989	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
100	0	0	0	2,99667	30,60296
1000	0	0	14,07821	36,73696	39,70421
10000	2,538631	8,604651	21,45251	36,29301	40,84187

- 15 Ejemplo 3 - Eficacias de interruptores de CAR-T anti-HER2-FITC con afinidades variables por CAR respectivos.

20 Las líneas celulares que expresan Her2 se han caracterizado bien para la densidad de antígeno, reflejando la caracterización de inmunohistoquímica clínica que clasifica las neoplasias malignas como 0 (<20.000 antígenos por célula), 1+ (100.000/célula), 2+ (500.000/célula) y 3+ (> 2.000.000/célula). La disponibilidad de líneas celulares

caracterizadas cuantitativamente para Her2 lo convierte en un sistema ideal para estudiar el efecto de la afinidad de CAR-T scFv sobre la densidad de antígeno. Basándose en datos preliminares que demostraron la eficacia de un interruptor de Her2 contra células SKBR3 (Her2, 3+), se sometieron a prueba las actividades de diversos interruptores Her2 contra las líneas de cáncer de mama MDA MB453 (Her2, 2+), MDA MB231 (Her2, 1+) y MDA MB468 (Her2, negativo, 0). Debido a que no existen terapias eficaces para el cáncer de mama Her2 1+ o 2+ no reseccable (solo se receta trastuzumab a pacientes 3+), la aplicación clínica de este CAR-T puede presentar una opción de tratamiento significativa para miles de mujeres con cáncer de mama no reseccable. Además, los ensayos clínicos con células CAR-T Her2 han demostrado que estas terapias son potencialmente tóxicas en altas dosis. El uso de un interruptor para activar o desactivar una respuesta de CAR-T puede ser particularmente ventajoso en este contexto.

Tabla 4. Actividad de interruptor de FITC mediante densidad de antígeno diana

SKBR3		% de citotoxicidad			
Concentración (pM)	4-4-20	4D5Flu	4M5.3	FITC-E2	
1	4,736842	6,952663	7,608696	15,92837	
10	15,89474	20,46351	33,69565	36,19227	
100	37,68421	39,00394	53,36439	51,46088	
1000	45,05263	51,13412	62,57764	54,38266	
10000	43,78947	53,59961	65,68323	55,04241	
MDA MB231		% de citotoxicidad			
Concentración (pM)	4-4-20	4D5Flu	4M5.3	FITC-E2	
1	0	0	0	0	
10	3,395062	8,403806	25,14029	12,71137	
100	32,65432	34,93658	55,66779	49,79592	
1000	36,97531	47,51586	57,68799	50,37901	
10000	30,4321	51,32135	59,48373	57,95918	
MDA MB468		% de citotoxicidad			
Concentración (pM)	4-4-20	4D5Flu	4M5.3	FITC-E2	
1	0	0	0	0	
10	0	0	0	0	
100	0	0	0	0	
1000	0	0	0	0	
10000	0	0	0	0	

Ejemplo 4. Características biofísicas de un interruptor óptimo

Una comprensión exhaustiva de las relaciones de actividad estructural en la sinapsis pseudoimmunológica es fundamental para hacer avanzar los CAR-EC conmutables a la candidatura clínica. Debido a que se usa una metodología de conjugación específica de sitio para crear los interruptores CAR-EC dados a conocer en el presente documento, pueden evaluarse las características biofísicas del interruptor que de lo contrario no podrían explorarse usando métodos tradicionales de conjugación no específicos (por ejemplo, geometría, longitud, valencia y formato de anticuerpos del interruptor y sus efectos sobre la activación de CAR-EC).

Mientras que el método de conjugación de dos etapas actual (ligación de oxima seguida por la química “click”, figura 2) era conveniente para la optimización del ligador, la conjugación de una sola etapa “click” es deseable para la producción escalable. Con este fin, se incorpora el aminoácido no natural *p*-azidofenilalanina (*p*AzF) para servir como sustrato proteínogénico “click” para la unión de una sola etapa del FITC-ligador (figura 5A). Para explorar el tamaño del interruptor usando esta estrategia de conjugación, la longitud del ligador PEG se varía desde 4 subunidades de PEG (16 Å) hasta 32 subunidades de PEG (112 Å) y se evalúa la capacidad del interruptor para mediar en la citotoxicidad. Los ligadores que son demasiado cortos interfieren con la unión, mientras que los ligadores excesivamente largos disminuyen la eficacia al aumentar la distancia entre el CAR-T y la célula diana.

Para estudiar adicionalmente el efecto de la conjugación específica de sitio sobre los CAR-EC conmutables, se incorpora *p*AzF en LC T109 o HC A123, que están a 30 Å o más de los sitios originales y “convierten” la geometría del interruptor en perpendicular a la sinapsis inmunológica. Además, estos sitios están más cerca de la interfaz de unión al antígeno del Fab y deben acercar el CAR-T a su diana. Se exploran mutaciones adicionales en todo el Fab.

Se sometieron a prueba los efectos de la valencia incorporando el residuo de *p*AzF en múltiples sitios en la proteína

simultáneamente para crear un sustrato multivalente. Los resultados preliminares indicaron que la conjugación de 2 moléculas de FITC tanto con LC S202 como con HC K136 fue tan eficaz como la conjugación con un sitio (figura 3C).

Ejemplo 5. Evaluación del sistema de CAR-T en modelos de ratones con xenoinjerto y singénicos y con tumores heterogéneos.

Después de la optimización de los interruptores y la reactividad fuera de diana *in vitro*, se analiza la eficacia de la plataforma de CAR-T en tres modelos de ratón: xenoinjerto, singénico y heterogéneo (véase el diagrama de flujo representado en la figura 4B). Las configuraciones óptimas de FITC-CAR-T se realizan en estudios *in vivo*. Debido a que es probable que la semivida en suero del interruptor tenga un gran impacto sobre la capacidad para regular la actividad *in vivo*, se evaluaron en primer lugar la PK de Fab e interruptores de IgG. Será importante equilibrar la semivida en suero con la capacidad para activar de manera segura una respuesta de células T persistente. Los Fab pueden ser un formato de anticuerpo ideal ($t_{1/2} = 3-4$ h) para la eficacia y el control de CAR-EC. No se espera que la modificación del anticuerpo con FITC altere significativamente la PK. La integridad de los conjugados de FITC en los estudios de PK se confirma mediante ELISA de tipo sándwich y espectroscopia de masas de alta resolución. Además de la administración intravenosa, también se evalúa la biodisponibilidad subcutánea.

Xenoinjerto

Para evaluar la eficacia, se usan modelos de xenoinjerto de ratón para comparar estas plataformas conmutables con las desarrolladas anteriormente por las plataformas de interruptor de CAR-T. Con este fin, se usan RS4; 11, NALM-6, Raji u otras líneas celulares positivas para CD19 para establecer modelos tumorales en ratones con inmunodeficiencia combinada grave diabéticos no obesos (NOD-SCID- γ^+ , NSG). Los FITC-CAR-EC se administran por vía intravenosa. El hallazgo del intervalo de dosis se realiza para el interruptor de FITC anti-CD 19, y se compara con un control de Fab frente a CD19 de tipo natural. La eficacia se considera basándose en la carga tumoral y la supervivencia global. Los ratones se monitorizan durante 90 días con extracciones de sangre semanales para monitorizar la proliferación de CAR-EC en sangre periférica. La caracterización inmunofenotípica detallada de los CAR-EC se centra en los fenotipos de efector, memoria, senescentes (diferenciados de manera terminal) o anergizados definidos según los parámetros fenotípicos convencionales mediante citometría de flujo multicanal. Esto es particularmente relevante para determinar si el desarrollo *in vivo* de CAR-EC conmutables está sesgado hacia un compartimento particular de célula T, lo que podría afectar a la persistencia clínica de las células en comparación con CAR-T-19.

La eficacia de los interruptores basados en Fab e IgG se suministra a dosificaciones apropiadas según los datos de PK observados y se compara. IgG puede ser la más eficaz en este modelo por su largo tiempo de residencia *in vivo*. La exploración adicional de esta idea se lleva a cabo en el modelo singénico.

Se obtienen muestras primarias de LLA o CLL derivadas de pacientes y para generar modelos de xenoinjerto en ratones NSG. Las muestras primarias se caracterizan por la expresión de CD19 mediante citometría de flujo. La leucemia se establece en ratones durante 2 a 3 semanas antes de la administración del tratamiento. La eficacia frente a CAR-T-19 se considera monitorizando los recuentos de blastos de ALL CD19⁺ en sangre periférica. En el caso de que la leucemia no se controle ni elimine, los blastos proliferados se someten a inmunofenotipado (buscando específicamente la pérdida de la expresión del antígeno CD19, véase a continuación para un estudio adicional). La persistencia de las CAR-EC también se monitoriza (aunque no se espera que esta última difiera sustancialmente de xenoinjertos basados en RS4; 11).

Singénico

Están sometiéndose a prueba CAR-EC conmutables para determinar la capacidad de revertir la aplasia de células B en un modelo de ratón de linfoma B de células inmunocompetentes. Para crear un CAR-T sustituto murino, se clona el receptor quimérico basado en FITC modificado por ingeniería genética en un vector retroviral basado en leucemia murina de Moloney para la transducción en esplenocitos murinos. Se usan los dominios de señalización de origen murino CD28 y CD3z. El anticuerpo anti-CD19 humano no reacciona de manera cruzada con CD19 de ratón; por tanto, se obtiene el hibridoma de rata anti-CD19 de ratón 1D3 (de la ATCC) y se secuencian las regiones variables. Esta secuencia se clona en un vector de expresión para la incorporación de aminoácidos no naturales para crear el interruptor y se clona en un receptor de antígeno quimérico para crear un sustituto de ratón CAR-T-19.

Después de la optimización de la transducción y la evaluación de la eficacia *in vitro*, se usa la línea celular MyC5-CD19 para establecer el linfoma de células B en ratones C57BL/6 de tipo natural. Las CAR-EC y los interruptores se administran con programas de dosificación basados en estudios de xenoinjerto y ensayos *in vitro* con un sistema sustituto. De particular interés en este modelo es comparar los interruptores basados en Fab e IgG con respecto a la tasa de desaparición de MyC5-CD19 y la supresión de células B. Al igual que con los estudios de xenoinjerto, se monitoriza la proliferación de CAR-T y se realiza la caracterización inmunofenotípica *ex vivo*. Después de la erradicación de las células de linfoma, se detiene la administración del interruptor y se monitoriza la repoblación de las células B en la sangre periférica. Se espera que tanto el sustituto CAR-T-19 como el interruptor sustituto CAR-T permitan la remisión a largo plazo, pero solo la plataforma conmutable permite la repoblación de células B. La infiltración de CAR-T en los órganos principales se monitoriza por medio de histología en cohortes predefinidas y el

análisis celular se lleva a cabo 180 días después de la terapia. Se sigue la persistencia a largo plazo de CAR-EC en ausencia de estimulación.

Interruptores de CAR-EC para seleccionar como diana tumores heterogéneos

Un segundo interruptor basado en el anticuerpo anti-CD20 rituximab para seleccionar como diana de manera secuencial o simultánea diferentes antígenos en el mismo paciente usando un único CAR-T transferido de manera adoptiva para combatir la recidiva de ALL atribuida a una variante de escape de CD19 durante la terapia con CAR-T-19.

Se crea un interruptor anti-CD20 de manera análoga al interruptor anti-CD 19 usando las características óptimas determinadas en el ejemplo 3. Se construye un CAR-T-20 basado en rituximab para comparación. Se somete a prueba la eficacia *in vitro* contra líneas de células IM-9 y Daudi positivas para CD20. Para crear un linfoblasto heterogéneo de células B, la línea celular K562 derivada de leucemia mielógena crónica (que es negativa para CD20 y CD19) se transduce de manera estable con el antígeno CD19 usando un vector lentiviral. Se obtienen clones de células individuales por medio de clasificación por flujo para obtener una población con expresión de CD19 homogénea. Esta línea celular se transduce luego con CD20 y se clasifica según el alto (CD20^{alto}) o bajo (CD20^{bajo}) nivel de expresión de antígeno. La activación y citotoxicidad del CAR-T conmutable en mezclas de CD19⁺CD20⁻ y CD19⁺CD20^{alto} o CD19⁺CD20^{bajo} se evalúan *in vitro* usando los interruptores de CD19 y CD20 (administración simultánea o secuencial). El método proporciona una oportunidad para estudiar el porcentaje más bajo de células CD20^{alto} o CD20^{bajo} en una población que son necesarias para estimular el CAR-T con el interruptor de rituximab. Este sistema se somete a prueba luego en un modelo de ratón de xenoinjerto. Se usa una mezcla de CD19⁺CD20⁻ y CD19⁺CD20⁺ para establecer el xenoinjerto. Alternativamente, se usan muestras de ALL derivadas de pacientes primarios para este experimento si se encuentra que son heterogéneas para la expresión de CD19 o CD20 en el estudio de xenoinjerto inicial. Se administran CAR-EC conmutables con el interruptor anti-CD20 para eliminar la población CD19⁺CD20⁺ y permitir el crecimiento de células CD19⁺CD20⁻. Para demostrar la viabilidad de redirigir el mismo CAR-T, posteriormente se dosifica el interruptor anti-CD 19 y se monitoriza el crecimiento del xenoinjerto restante. Los tumores se evalúan para determinar la expresión de antígenos en cohortes de ratones sacrificados o en blastos primarios. También se evalúa la selección como diana simultánea. El tratamiento se compara con CAR-T-19, CAR-T-20, o ambos simultáneamente. Esta metodología puede ofrecer una ventaja significativa contra la propensión a la recidiva en el entorno clínico mientras se evita la pérdida persistente de células B.

Ejemplo 6. Interruptores de molécula pequeña.

PBMC y líneas celulares

Se aislaron de manera reciente PBMC humanos de sangre completa de donantes sanos mediante centrifugación con medio de gradiente de densidad Ficoll-Paque PLUS (GE healthcare, Piscataway, NJ) según el protocolo del fabricante. Las células se activaron de inmediato con el activador-efector humano CD3/CD28 Dynabeads (Life Technologies, Carlsbad, CA) en una proporción de 3:1 (perla con respecto a célula) en medio AIM-V (Life Technologies) que contenía suero humano AB al 5% (Valley Biomedical, Winchester, VA). La producción de lentivirus se llevó a cabo usando líneas celulares HEK293FT. El sobrenadante viral se usó directamente para transducir PBMC activadas mediante espinoculación en presencia de sulfato de protamina e IL2 humana recombinante (sistemas R&D, Minneapolis, MN). Las líneas celulares C4-2, KB y A549 se mantuvieron en RPMI-1640, medio esencial mínimos de Eagles y medio F-12K complementado con el 10% de suero bovino fetal, respectivamente (todos de Life Technologies).

La figura 5 muestra la estructura de P-TriA-FITC. La figura 5B representa un esquema para la síntesis del ligador de ácido TriA-2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico que va a conjugarse con FITC. La figura 5C representa los resultados de un ensayo de citotoxicidad de 24 horas de células anti-FITC-CAR T que seleccionan como diana células de cáncer de próstata C4-2 (PSMA+) con diluciones en serie de P-TriA-FITC. Cada concentración se llevó a cabo por triplicado. Los resultados se muestran como porcentaje de citotoxicidad promedio. Los valores numéricos para la gráfica representada en la figura 5C se muestran en la tabla 5.

Concentración (pM)	4M5.3			Células T no transducidas		
0,000000	4,662171	4,215603	5,510651	0,176394	0,346090	1,203501
0,000512	3,992319	3,358192	4,688965	1,417854	0,846247	1,051668
0,002560	3,661859	2,491850	2,206047	0,265708	0,846247	0,140669
0,012800	3,554682	1,303979	1,205734	1,632206	0,149600	0,855178
0,064000	2,840173	2,447193	4,572858	0,506855	-0,814990	0,881972
0,320000	2,223909	2,545438	2,965212	0,194257	0,551512	-0,189790
1,600000	4,340642	3,652927	3,956594	-0,341620	0,551512	1,212432
8,000000	9,172509	10,762290	7,582727	1,408922	0,462198	0,551512
40,000000	52,561070	55,812080	53,561380	-1,109720	-0,582770	1,176707

200,000000	77,220560	76,532850	73,915960	-0,529180	0,506855	-0,422010
1000,000000	82,624030	79,944630	78,908590	0,024561	0,096012	0,042424
5000,000000	82,043500	77,452780	78,006520	1,051668	-0,913230	0,113875

5 La figura 6A muestra la estructura de folato-FITC. La figura 6B-6C representa los resultados de un ensayo de citotoxicidad *in vitro* de anti-FITC-CAR-T coinubados con célula dianas KB (FR+) (véase la figura 6B) o A549 (FR-) (véase la figura 6C) en presencia de concentraciones variables de folato-FITC. Cada concentración se llevó a cabo por triplicado. Los resultados se muestran como porcentaje de citotoxicidad promedio. Los valores numéricos para el gráfico representado en las figuras 6B y 6C se muestran en las tablas 6 y 7, respectivamente.

Tabla 6. Citotoxicidad del interruptor de FITC-folato en células FR+

KB Concentración (pM)	% de citotoxicidad	
	4M5.3	células T no transducidas
0	5,777075	1,843410667
0,32	8,299503	2,267117
1,6	16,50075	3,005248333
8	37,10323	2,186593667
40	68,10538	2,880628667
200	74,5856	2,324634
1000	77,07735	2,380233333
5000	76,95082	2,042802

10

Tabla 7. Citotoxicidad del interruptor de FITC-folato en células FR

A549 Concentración (pM)	% de citotoxicidad	
	4M5,3	células T no transducidas
0	0,483774	0,212992333
0,32	0,957294667	-0,985726667
1,6	0,526652	-1,021143333
8	0,765276333	-1,052836667
40	2,554960333	-1,51517
200	5,776392333	-0,959626667
1000	5,873333	-1,157236667
5000	3,145929	-1,613976667

Ejemplo 7. Construcción de interruptores de CAR-T y CAR

15

Los CAR se construyeron tal como sigue:

20

Se diseñó LV-EFla-4-4-20-BBZ (SEQ ID NO: 1) para seleccionar como diana isotiocianato de fluoresceína (FITC). Se generó el scFv 4-4-20 con una afinidad de 20 nM a partir de hibridoma de ratón, y se maduró mediante trasplante de regiones de entramado o intercambio de ADN propenso a errores. Se construyó con la cadena ligera precediendo a la cadena pesada y un ligador (GGGGS)₆, (SEQ ID NO. 57, en la que n=6) a partir de la referencia de Plückthun A. Improving *in vivo* folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting. Protein Eng. Agosto de 1997; 10(8):959-66.

25

Se diseñó LV-EFla-4D5Flu-BBZ (SEQ ID NO: 2) para seleccionar como diana isotiocianato de fluoresceína (FITC). Se generó el scFv 4D5Flu con una afinidad de 20 nM trasplantando las CDR de 4-4-20 a la región de entramado de Her2/neu scFv 4D5 humanizado. Se construyó con la cadena ligera precediendo a la cadena pesada y un ligador (GGGGS)₆, (SEQ ID NO. 57, en la que n=6) de la referencia de Jung S, Plückthun A. Improving *in vivo* folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting. Protein Eng. Agosto de 1997; 10(8):959-66.

30

Se diseñó LV-EFla-4M5.3-BBZ (SEQ ID NO: 3) para seleccionar como diana isotiocianato de fluoresceína (FITC). Se generó el scFv 4M5.3 con una afinidad de 0,3 pM a partir de su scFv 4-4-20 original mutagenizado mediante intercambio de ADN propenso a errores. Se construyó con la cadena ligera precediendo a la cadena pesada y un ligador de 25 aminoácidos (SSADDAKKDAKKDDAKKDDAKKDG), (SEQ ID NO. 58) de la referencia de Boder ET, Midelfort KS, Wittrup KD. Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. Proc Natl Acad Sci U S A. 26 de septiembre de 2000; 97(20):10701-5.

35

Se diseñó LV-EFla-FITC-E2-BBZ (SEQ ID NO: 4) para seleccionar como diana isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Se seleccionó el scFv FITCE2 con una afinidad de 0,3 nM a partir de una biblioteca de scFv humanos sin tratamiento previo usando presentación en fago. Se construyó con la cadena pesada precediendo a la cadena ligera y un ligador (GGGGS)₃, (SEQ ID NO. 57, en la que n=3) de la referencia Vaughan J, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, McCafferty J, Hodits RA, Wilton J, Johnson KS. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. Nat Biotechnol. Marzo de 1996; 14(3):309-14.

Los dominios de interacción con la diana (TID) del interruptor de CAR-T se construyeron tal como sigue:

pBAD-CD19wt (SEQ ID NO: 5) comprende un Fab que selecciona como diana el receptor anti-CD19 humano de ratón, encontrado en la superficie de células B, y los tumores malignos relacionados. La secuencia se construyó insertando dominio VH y VL anti-CD19 humano de ratón en el entramado de CH1 y CL humano. La secuencia era de Milone MC, Fish JD, Carpenito C, Carroll RG, Binder GK, Teachey D, Samanta M, Lakhai M, Gloss B, Danet-Desnoyers G, Campana D, Riley JL, Grupp SA, June CH. Chimeric receptors containing CD 137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo*. Mol Ther. Agosto de 2009; 17(8):1453-64. La secuencia se derivaba del anticuerpo anti-CD 19 FMC63. La secuencia se clonó en el vector pBAD.

pBAD-CD19 LS202X mt (SEQ ID NO: 6) comprende un Fab que selecciona como diana el receptor anti-CD 19 humano de ratón, encontrado en la superficie de células B, y los tumores malignos relacionados. La secuencia se construyó insertando dominio VH Y VL anti-CD19 humano de ratón en el entramado de CH1 y CL humano. Hay un sitio mutante ámbar en la serina 202 de la cadena ligera. El sitio mutante ámbar permite la incorporación de un aminoácido no natural.

pBAD-CD19 HK136X mt (SEQ ID NO: 7) comprende un Fab que selecciona como diana el receptor anti-CD 19 humano de ratón, encontrado en la superficie de células B, y los tumores malignos relacionados. La secuencia se construyó insertando dominio VH Y VL anti-CD19 humano de ratón en el entramado de CH1 y CL humano. Hay sitios mutantes ámbar en la lisina 136 de la cadena pesada. El sitio mutante ámbar permite la incorporación de un aminoácido no natural.

pBAD-CD19 LS202/HK136X mt (SEQ ID NO: 8) comprende un Fab que selecciona como diana el receptor anti-CD19 humano de ratón, encontrado en la superficie de células B, y los tumores malignos relacionados. La secuencia se construyó insertando dominio VH y VL anti-CD19 humano de ratón en el entramado de CH1 y CL humano. Hay dos sitios mutantes ámbar en la serina 202 de la cadena ligera y la lisina 136 de la cadena pesada. Los sitios mutantes ámbar permiten la incorporación de aminoácidos no naturales.

Ejemplo 8. Citotoxicidad del interruptor de CAR-T de anticuerpo frente a α CS1-FITC

Se sometió a ensayo la citotoxicidad de un interruptor de CAR-T de anticuerpo frente a α CS1-FITC en la línea celular MM.1S. Se clonaron regiones variables a partir del clon anti-CS1 HuLuc63 (SEQ ID NO: 10 u 11) en regiones constantes humanas en un formato de Fab y se expresaron a partir de un vector pBAD en células de *E. coli*. Se purificó Fab mediante proteína G y se conjugó de manera no específica con FITC usando moléculas de ligador-FITC activadas con NHS-éster. Las conjugaciones produjeron razones de anticuerpo con respecto a FITC que oscilaban entre 0,5 y 1,5. Para evaluar la citotoxicidad, se usó el CAR-T anti-FITC derivado del scFv FITC-E2 a una razón de 10:1 contra células dianas con concentraciones variables del interruptor anti-CS1-FITC conjugado.

Tabla 8. Citotoxicidad del interruptor de anticuerpo frente a α CS1-FITC en la línea celular MM.1S (CS1⁺CD19⁻)

Concentración (pM)	% de citotoxicidad	
	Interruptor de α CS1-FITC	Interruptor de α CD19-FITC
10	97,29295	4,996922
1	81,90135	8,273115
0,1	54,43238	4,841375
0,01	5,488979	-0,8360615
0,001	1,685213	-3,69422
0,0001	1,669164	6,05658
0,00001	3,715493	9,459152

Ejemplo 9. Citotoxicidad del interruptor de CAR-T de anticuerpo frente a α BCMA-FITC

Se sometió a ensayo la citotoxicidad de interruptor de CAR-T de anticuerpo frente a α BCMA-FITC en la línea celular RPMI 8226 (BCMA⁺). Se clonaron regiones variables del clon anti-BCMA BCMA98 (SEQ ID NO: 14 o 15) en regiones constantes humanas en un formato de Fab y se expresaron a partir de un vector de pBAD en células de *E. coli*. Se purificó Fab mediante proteína G y se conjugó de manera no específica con FITC usando moléculas de ligador-FITC activadas con NHS-éster. Las conjugaciones produjeron razones de anticuerpo con respecto a FITC que oscilaban

entre 0,5 y 1,5. Para evaluar la citotoxicidad, se usó el CAR-T anti-FITC derivado del scFv FITC-E2 a una razón de 10:1 contra células dianas con concentraciones variables del interruptor anti-BCMA-FITC conjugado.

Tabla 9. Citotoxicidad del interruptor de anticuerpo frente a α BCMA-FITC anticuerpo en la línea celular RPMI 8226 (BCMA⁺)

Concentración (pM)	% de citotoxicidad	
	Interruptor de α BCMA-FITC	
10	57,57705	
1	48,45045	
0,1	24,6988	
0,01	0,7577045	
0,001	-3,643465	
0,0001	-2,776545	
0,00001	-1,573434	

Ejemplo 10. Citotoxicidad del interruptor de CAR-T de anticuerpo frente a α EGFRvIII-FITC

Se sometió a ensayo la citotoxicidad de interruptor de anticuerpo frente a EGFRvIII-FITC en la línea celular U87MGAEGFR (EGFRvIII⁺) y A549 (EGFRvIII^{bajo}). Se clonaron regiones variables del clon anti-EGFRvIII hu806 (SEQ ID NO: 12 y 13) en regiones constantes humanas en un formato de Fab y se expresaron a partir de un vector de pBAD en células de *E. coli*. Se purificó Fab mediante proteína G y se conjugó de manera no específica con FITC usando moléculas de ligador-FITC activadas con NHS-éster. Las conjugaciones produjeron razones de anticuerpo con respecto a FITC que oscilaban entre 0,5 y 1,5. Para evaluar la citotoxicidad, se usó el CAR-T anti-FITC derivado del scFv FITC-E2 a una razón de 10:1 contra células dianas con concentraciones variables del interruptor anti-EGFRvIII-FITC conjugado.

Tabla 10. Citotoxicidad del interruptor de anticuerpo frente a α EGFRvIII-FITC en la línea celular U87MG Δ EGFR (EGFRvIII⁺) y la línea celular A549 (EGFRvIII^{bajo})

Concentración (pM)	% Citotoxicidad	
	A549 (EGFR ^{bajo})	U87MG Δ EGFR (EGFRvIII ⁺)
10	1,6	34,5
1	0,7	31,4
0,1	-0,5	24,1
0,01	-0,1	9,7
0,001	0	1
0,0001	1,2	3
0,00001	1,2	1,5

Ejemplo 11: Optimización del sitio de conjugación de FITC en Fab anti-CD19

Aunque las células anti-FITC-CAR-T dadas a conocer en el presente documento se componen de dominios de señalización similares a las células CAR-T convencionales, la activación de las células CAR-T conmutables se basa en la formación del complejo ternario (por ejemplo, célula diana, interruptor de anticuerpo y célula CAR-T) en comparación con el complejo binario (por ejemplo, célula diana y célula CAR-T) observado con células CAR-T convencionales. Por tanto, cada componente del complejo ternario se estudia para determinar los parámetros óptimos para la plataforma de CAR-EC universal. Con el fin de estudiar el efecto del sitio de conjugación, se expresaron varios mutantes de Fab anti-CD 19, en los que se incorporó pAzF en diferentes posiciones en la cadena ligera (LC) y cadena pesada (HC) de Fab anti-CD 19 (figura 9A). La pAzF se incorporó en las posiciones serina 202 (LCS202), glicina 68 (LCG68) y treonina 109 (LCT109) de la cadena ligera del Fab anti-CD 19. La pAzF se incorporó en las posiciones serina 74 (HCS74), alanina 121 (HC121), lisina 136 (HCK136) de la cadena pesada del Fab anti-CD 19. También se construyeron mutantes dobles incorporando pAzF en la serina 202 de la cadena ligera y lisina 136 de la cadena pesada (LCS202/HCK136) e incorporando pAzF en la serina 74 de la cadena pesada y glicina 68 de la cadena ligera (HCS74/LCG68). En resumen, se coexpresaron pares de ARNt y aminoacil-ARNt sintetasa (aaRS) supresores ámbar ortogonales en *E. coli* con genes de Fab que contenían un codón TAG en diferentes posiciones, y se permitió que los cultivos crecieran e incorporaran pAzF en los codones TAG introducidos. Tras la lisis periplásmica de *E. coli*, se purificaron los Fab mediante purificación por afinidad a proteína G. El peso molecular y la incorporación específica de sitio de pAzF en los Fab se verificaron mediante SDS-PAGE gel y ESI-EM. Los Fab mutantes que contenía pAzF en diferentes sitios se modificaron entonces de manera específica de sitio con el ligador de ciclooctino-FITC en una reacción de una sola etapa (figura 9B). Los conjugados de anticuerpo finales se purificaron entonces mediante cromatografía de exclusión molecular y se caracterizaron mediante SDS-PAGE (figura 11 y figura 21) y ESI-EM (figura 10A-N y figura 22A-H). Tal como se muestra en la figura 11, el carril 1 es el patrón de proteína, el carril 2 es LCG68,

el carril 3 es LCT109, el carril 4 es HCS74, el carril 5 es HCA121, el carril 6 es LCS202, el carril 7 es HCK136, el carril 8 es LCS202/HCK136, el carril 9 es el blanco y el carril 10 es LCS202/HCK136 tratado con DTT. Tal como se muestra en la figura 21, el carril 1 es el patrón de proteína, el carril 2 es LCS202 (sin DTT), el carril 3 es HCS74 (sin DTT), el carril 4 es HCS74/LCG68 (sin DTT), e carril 5 es WT:DAR ~1 (sin DTT), el carril 6 es el blanco, el carril 7 es LCS202 (con DTT), el carril 8 es HCS74 (con DTT), el carril 9 es HCS74/LCG68 (con DTT) y el carril 10 es WT:DAR ~1 (con DTT). La figura 10A muestra la exploración de ESI-EM para HCS74. La figura 10B muestra la exploración de ESI-EM para HCK136. La figura 10C muestra la exploración de ESI-EM para LCS202/HCK136. La figura 10D muestra la exploración de ESI-EM para HCA121. La figura 10E muestra la exploración de ESI-EM para LCG68. La figura 10F muestra la exploración de ESI-EM para LCS202. La figura 10G muestra la exploración de ESI-EM para LCT109. La figura 10H muestra la exploración de ESI-EM deconvolucionada para HCS74. La figura 10I muestra la exploración de ESI-EM deconvolucionada para HCK136. La figura 10J muestra la exploración de ESI-EM deconvolucionada para LCS202/HCK136. La figura 10K muestra la exploración de ESI-EM deconvolucionada para HCA121. La figura 10L muestra la exploración de ESI-EM deconvolucionada para LCG68. La figura 10M muestra la exploración de ESI-EM deconvolucionada para LCS202. La figura 10N muestra la exploración de ESI-EM deconvolucionada para LCT109. La figura 22A muestra la exploración de ESI-EM para HCS74/LCG68. La figura 22B muestra la exploración de ESI-EM para anti-CD 19-FITC de tipo natural DAR~2. La figura 22C muestra la exploración de ESI-EM para anti-CD 19-FITC de tipo natural DAR~1. La figura 22D muestra la exploración de ESI-EM para anti-CD 19-FITC de tipo natural DAR~0,5. La figura 22E muestra la exploración de ESI-EM deconvolucionada para HCS74/LCG68. La figura 22F muestra la exploración de ESI-EM deconvolucionada para anti-CD 19-FITC de tipo natural DAR~2. La figura 22G muestra la exploración de ESI-EM deconvolucionada para anti-CD19-FITC de tipo natural DAR~1. La figura 22H muestra la exploración de ESI-EM deconvolucionada para anti-CD 19-FITC de tipo natural DAR~0,5. Tras la finalización de la conjugación específica de sitio con una molécula de FITC, se evaluó la actividad citolítica *in vitro* de células CAR-T de anti-FITC (FITC-E2) en presencia de diferentes concentraciones de moléculas de interruptor usando la línea de leucemia de células B CD19+ NALM-6 como células dianas. En resumen, se cocultivaron células anti-FITC-CAR-T (FITC-E2) y NALM6 (CD19+) a una razón de efector con respecto a diana de 5 a 1 con diluciones en serie de diversas moléculas de interruptor conjugadas con Fab anti-CD19-FITC. Se midió la citotoxicidad mediante citometría de flujo. Tal como se muestra en la figura 12 y las tablas 11 y 12, la mayoría de las moléculas de interruptor demostraron una potente eficacia *in vitro* a intervalos picomolares. Notablemente, dos sitios de conjugación ubicados en la región variable del anticuerpo, LG68 y HS74, demostraron actividad superior en comparación con otras posiciones. Además, el interruptor de anti-CD 19-FITC de conjugado doble HS74/LG68X demostró la mejora más significativa en la eficacia, dando como resultado actividad subpicomolar ($CE_{50} = 0,07 \text{ pM}$) en las configuraciones de ensayo. Por tanto, estos resultados demuestran la importancia de determinar el sitio de conjugación ideal de cada Fab en el desarrollo de una molécula de interruptor óptima.

Tabla 11. CE_{50} de citotoxicidad de interruptores de CAR-T de Fab anti-CD 19-FITC y células anti-FITC-CAR T (FITC-E2) hacia células NALM6 (CD19+).

Mutación	LG68X	LT109X	HS74X	HA121X	LS202X	HK136X	LS202X/ HS74X	Aleatorio/ DAR-0,5	Aleatorio/ DAR-1	Aleatorio/ DAR-2
CE_{50} [pM]	3,53	2,823	0,97	3,39	3,80	2,43	2,53	2,60	2,19	1,46

Tabla 12. Citotoxicidad de diversas concentraciones de interruptores de CAR-T de Fab anti-CD 19-FITC y células anti-FITC-CAR T (FITC-E2) hacia células NALM6 (CD19+).

Conc. (pM)	% citotoxicidad									
	aCD19-FITC LG68X	aCD19-FITC LT108X	aCD19-FITC HA121X	aCD19-FITC HA121X	aCD19-FITC LS202X	aCD19-FITC HK136X	aCD19-FITC LS202X/HK136X	aCD19-FITC aleat. DAR (0,5)	aCD19-FITC aleat. DAR (1,0)	aCD19-FITC aleat. DAR (2,0)
0,01	0	0	0	4,408353	0,465116	1,502146	0	0	0	4,98576
0,1	3,846154	7,537155	21,42857	0	8,139535	0	14,94737	24,18953	0	0
1	17,78846	17,19746	47,55102	18,79351	25,5814	25,1073	26,94737	24,93766	23,0137	31,9088
10	56,73077	66,66667	74,69388	64,03713	60,23256	69,95709	60	67,0823	53,1507	60,9687
100	78,125	76,22081	89,59184	78,42227	83,95349	86,2661	76,63158	71,82045	72,0548	69,5158
1000	74,51923	77,91932	92,85715	84,45476	87,67442	86,05151	77,05263	81,79551	66,5754	74,9289

Ejemplo 12. Eficacia in vivo de FITC-CART y P-TriA-FITC

Estudios farmacocinéticos (PK) del interruptor de molécula pequeña que selecciona como diana PSMA, P-TriA-FITC en ratones revelaron que el compuesto tiene una modesta semivida intravenosa (i.v.) ($t_{1/2} = 1,08 \pm 0,14 \text{ h}$). En resumen, se establecieron tumores C4-2 subcutáneos (PSMA+) en ratones con inmunodeficiencia combinada grave diabéticos no obesos (NOD-SCID- $\gamma^{-/-}$, NSG). Tras la formación de tumores palpables ($> 200 \text{ mm}^3$ de longitud o anchura del tumor), se transfirieron de manera adoptiva células FITC-CART (FITC-E2) mediante inyecciones intraperitoneales y se administraron por vía intravenosa dosis diarias de P-TriA-FITC a 1 mg/kg durante 10 días consecutivos. Tras la

finalización del tratamiento con interruptor, los tumores habían experimentado regresión en ratones que habían recibido células FITC-CART y P-TriA-FITC mientras que el crecimiento tumoral continuó en ratones que recibieron o bien células CART o bien interruptor solo, o células CART con dosis diarias de vehículo (PBS), véase la figura 13. Estos estudios de eficacia *in vivo* indican que las células FITC-CART en combinación con interruptores de P-TriA-FITC son altamente eficaces en la selección como diana de tumores positivos para PSMA. Estudios adicionales pueden implicar la caracterización y optimización para demostrar la capacidad de titulación de la dosis *in vivo* de las células CAR-T conmutables.

Ejemplo 13. Evaluación de interruptor de CAR-EC anti-FITC y FITC-anti-CD19 en el tratamiento de linfomas de células B

Propósito: Este estudio evalúa la eficacia y seguridad de una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) que comprende una célula efectora que expresa un receptor de antígeno quimérico (CAR) y un interruptor en el tratamiento de linfomas de células B. El CAR comprende una región externa que comprende un scFv anti-FITC. El interruptor comprende un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que comprende FITC y un dominio de interacción con la diana que comprende un scFv anti-CD 19.

Estado	Intervención	Fase
Linfomas de células B	Genética: células anti-FITC CAR T e interruptor de scFv anti-CD19-FITC	Fase I, fase II

Tipo de estudio: De intervención

Diseño del estudio: Clasificación de criterios de valoración: Estudio de seguridad/eficacia

Modelo de intervención: Asignación de un único grupo

Enmascaramiento: Etiqueta abierta

Propósito primario: Tratamiento

Medidas de desenlace primario:

Número de pacientes con acontecimientos adversos. [Lapso de tiempo: 2 años.]

[Designado como problema de seguridad: Sí]

Determinar el perfil de toxicidad de las células CAR T con criterios de toxicidad comunes para acontecimientos adversos (CTCAE) versión 4.0.

Medidas de desenlace secundario:

Tiempo de supervivencia de células anti-FITC CAR T *in vivo*. [Lapso de tiempo: 2 años.]

[Designado como problema de seguridad: No] Medir la supervivencia de células CAR T transducidas con el vector lentiviral anti-FITC.

Tasas de respuesta a las células CAR T. [Lapso de tiempo: 2 años.]

[Designado como problema de seguridad: No] Describir las tasas de respuesta de pacientes tratados con células CAR T de 4ª generación, incluyendo remisión parcial (PR), remisión completa (CR), enfermedad estable (SD) y enfermedad progresiva (PD).

Tiempo de supervivencia de los pacientes. [Lapso de tiempo: 2 años.] [Designado como problema de seguridad: No] Evaluar el tiempo de supervivencia de los pacientes tratados con las células CAR T de 4ª generación, incluyendo la supervivencia libre de progresión (PFS) y supervivencia global (OS).

Inclusión estimada:	20
Fecha de inicio del estudio:	TBD
Fecha estimada de finalización del estudio:	TBD
Fecha de finalización primaria estimada:	TBD (fecha de recogida de datos final para medida de desenlace primario)

Brazos	Intervenciones asignadas
Experimental: células CAR T células CAR T anti-FITC autólogas	Genética: Células anti-FITC CAR T autólogas de 4ª generación células anti-FITC CAR T transducidas con lentivirus extraíbles

Descripción detallada:

5 Las células T modificadas por ingeniería genética con receptor de antígeno quimérico (CAR) basado en anticuerpos de cadena sencilla frente a CD19 han demostrado un gran potencial clínico en el tratamiento de leucemias de células B agudas y crónicas. Los linfomas de células B, similares a las leucemias de células B, expresan las moléculas de superficie CD19, y la mayoría de los pacientes con linfoma de células B no pueden curarse mediante la quimiorradioterapia convencional. La terapia con células T adoptiva basadas en CAR frente a CD19 está asociada con un efecto adverso no deseado, la pérdida de células B CD19, lo que da como resultado inmunodeficiencia humoral.

10 Este estudio evaluará un interruptor de scFv anti-CD19-FITC y células CAR-T anti-FITC novedoso para determinar tanto la eficacia como la seguridad en pacientes con linfoma. Los pacientes que reciben los interruptores de scFv anti-CD19-FITC y células CAR-T anti-FITC se monitorizarán estrechamente para determinar la respuesta a la infusión, el efecto de erradicación tumoral, la longevidad de las células CAR T y la recuperación de funciones de células B tras la retirada del interruptor de scFv anti-CD 19-FITC y/o células CAR T.

15 Elegibilidad

Edades elegibles para el estudio:	18 años en adelante
Géneros elegibles para el estudio:	Ambos
Se aceptan voluntarios sanos:	No

20 Criterios

Criterios de inclusión:

- Pacientes con linfoma de células B CD19(+) con recidiva o refractario demostrado mediante inmunohistoquímica (IHC) o citometría de flujo.
- No elegibles para trasplante de células madre autólogas (ASCT) o con recidiva tras ASCT.
- Estado de rendimiento del Grupo de oncología cooperativo del este (*Eastern Cooperative Oncology Group*, ECOG) de 0-2.
- Edad ≥ 18.
- Oximetría de pulso de > 90% con aire de la sala.
- Función hepática adecuada, definida como alanina transaminasa (ALT) <3 x límite superior de lo normal (ULN), aspartato aminotransferasa (AST) <3 x ULN; bilirrubina y fosfatasa alcalina séricas <2 x ULN.
- Función renal adecuada, definida como creatinina sérica <2,0 mg/dl.
- Función cardíaca adecuada con LVEF ≥ 50%
- Hb ≥ 80 g/l
- Puede identificarse enfermedad medible.
- Esperanza de vida ≥ 3 meses.
- Los pacientes sexualmente activos deben estar dispuestos a utilizar uno de los métodos anticonceptivos más eficaces durante el estudio y durante 1 año después de que concluya el estudio. La pareja masculina debe usar un condón.
- Los pacientes deben firmar un consentimiento informado.

55 Criterios de exclusión:

- Infección activa incontrolada.
- Infección activa con virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC).

- Positivo para VIH

- Embarazo o lactancia.

5

- Incluido actualmente en otro ensayo clínico.

- Uso simultáneo de esteroides sistémicos.

10 Aunque se han mostrado y descrito realizaciones preferidas de la presente invención en el presente documento, resultará obvio para los expertos en la técnica que tales realizaciones se proporcionan a modo de ejemplo solo.

Tabla 13. Secuencia de nucleótidos de CAR		
NOMBRE	SEQ ID	SECUENCIA
LVEF1a-4-4-20-BBZ	1	cagggtggcacttttcgggggaaatgtgcgcggaaccctatttgttatttttctaatacattcaaatatgtatccgctcatga gacaataaccctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagatgagattcaacattccgtgcgccctattcc ctttttgcggcatttgccttctgttttgctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtg cacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtgaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgtttccaatg

	<p>atgagcactfftaagtctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggctgccgcat acactattctcagaatgacttgggtgagtaactaccagtcacagaaaagcaactctacggatggcatgacaglaagagaat fatgagctgctgccataaccatgagtgataaactcggcccaactactctgacaacgatcggaggaccgaaggagc taaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacca aacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactactact ctagctcccggcaacaaltaatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccactctgcctcggccctccgg ctggctggttattgctgataaatctggagccggtagcgtgggtctcgcggtatcattgacgactggggccagatggt aagccctcccgtatcgtagtattacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgag ataggtgacctactgattaagcattggaactgtcagaccaagtactcatatatactttagattgattaaactcatttta attfaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgctcactgagcgtc agaccccgtagaaaagatcaaaggatctcttgagatcctttttctgcccgtaatctgctgcttgcgcaaaaaaac accgctaccagcgggtggttgggtgcccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggttaactggctcagcagagcgc agataccaaatactctcttagtgtagccgtagtagccaccactcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgc ctctgctaactctgttaccagtggctgctgccagtgggcgataagtcgtgcttaccgggttgactcaagacgatagttac cggataaggcgcagcggctgggctgaacgggggggtctggtgacacagcccagctggagcgaacgacctacaccg aactgagatactacagcgtgagctatgagaaagcggcagctccgaaggaggaaagggcggacaggtatccggt aagcggcagggcgggaacaggagagcgcacgagggagctccagggggaacgcctggtatctttatagctctgctc gggttccaccctcactgactgagcgtcattttgtgatgctcgtcagggggggcggagcctatggaaaaacgccagca acgcgcccttttacggtcctggcctttgctggcctttgctcacatgcttctctgcttaccctgattctgtgataa ccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacgaccgagcgcagcagtgagtgagcagag gaagcggaaagagcggccaatagcaaacgcctctccccgcgcttggccgalttaataatgagctggcagcagaca ggtttcccactggaaagcgggcagtgagcgaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccagcgttt acactttatgctccgctcgtatgtgtggaattgtgagcgggataacaattcacacaggaacagctatgacctgat tacgccaagcgcgaattaaccctcactaaagggaaacaaaagctggagctgcaagcttaattgtagcttattgcaact ctgtagcttgcaacatggaacgatgagttagcaacatgcttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattg gtggaagtaagtggtacgatcgtgcttattaggaaggcaacagagggctgacatggattggacgaaccactgaa ttccgcatgacagatattgtattaaagtccctagctcagatacaaaaacgggtctctggttagaccagatctgagcc tgggagctctctggcctaactagggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtctcaagtagtgtgccc cgtctgtgtgactctgtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtgaaaaatctctagcagtgccgcccga acagggacctgaaagcgaagggaaaccagagctctctcagcagcaggactcggcttctgtaagcgcgcacggcaa gaggcgagggggcggcactgggtgagtagccaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgctg agagcgtcagttataagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggtaaggccaggggggaaagaaaa atataaataaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatctggcctgttagaacatcag aaggctgtagacaataactgggacagctacaaccatccctcagacaggtatcagaagaacttagatcattataataca gtagcaaccctctattgtgtcatcaaggatagagataaaagacaccaagggaagctttagacaagatagaggagag caaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgacttcagacctggaggaggagatagaggacaat tggagaagtgaattataaatafaaaagtagfaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaaga gtggtgacagagaaaaaagagcagtgggaaataggagcttgttcttgggttcttgggagcagcaggaaagcactatg ggcgcagcctcaatgacgtgacggtacaggccagacaattattgtctgtatagtgacgagcagacaatttctgta gggctattgaggcgcacagcactctgttgcaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctg tggaaagatacctaaaggatcaacagctctggggatttgggggtgctctgaaaaactcattgaccactgctgtgcctt ggaatgctagttggagtaataaatctctggaacagattggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaa caattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaat tagataaatgggcaagttgtggaattggttlaacataacaaattggctgtggtatataaaattatcataatgatagtagga ggcttggttaggttaagaatggtttgctgtactttctatagtgaaatagattaggcagggatattcaccattatcgttcag acccactcccaaccggaggggacccgacagggccgaaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagag acagatccattcagattagtaacggatctcagcggtaactttaaaaaaggggggattgggggtacagtgacag gggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaattcaaaaacaaattcaaaaattcaaaat atcagccttgcaaaagatggataaagtttaaacagagaggaaatcttgcagctaattggacctcttaggtcttgaaggag tgcctcgtgaggctccgggtcccgcagtgggcagagcgcacatgccacagctcccagagaagttggggggagg</p>
--	--

	<p>ggctggcaattgaaccggtgcctagagaagggtggcgcgggggtaaactgggaaagtgatgctgtactggctccgc ttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgctgaaacgttcttttccgaaacgggtttgccgc agaacacaggttaagtccgtgtgtgttcccgcggcctggcctctttacgggttatggccttgcgtgctgaattac ttccacctggctgcagtagtattcttgatcccagcttccgggttggaaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgctt aaggagccccctgcctcgtgcttgaagttgagcctggcctggggcgtggggccgcgctgcaatctgggtggcac cttcgctcgtctcgtcttctgataagttcttagccattfaaaattttgatgacctgctgacgcttttttctggcaag atagctttgtaaatgcccggccaagatctgcacactgggtatttgggttttggggccgcggggcggcagcggggcccgtg cgtcccagcgcacatgttcggcgagggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaag ctggccggcctgctctgtgctggcctcgcgcccgctgtatcggccctggggcggcaaggtggcccggctg ggcaccagttgctgagcggaaagatggccgcttcccggcctgctgcaaggagctcaaatggaggacgcggcg ctcgggagagcggggcgggtgagtcacccacacaaggaaaaggccttccgtcctcagccgtcgtctatgtgact ccacggagtagcggcgccgtccaggcactcgtatgtctcagcttttggagtacgctgcttttaggttgggggga ggggtttatgcatggagttcccacactgagtggtgggagactgaagttagccagcttggcactgagtaattctc cttggaaattgcccttttggatttggatctgttcaatctcaagcctcagacagtggttcaaaatttttctccattcagg gtcgtgaggaatcggtagccggccggggatccatggccttaccagtaccgcttgcctcgtcggcgtggcct tgctgctccagccgcccagccggatgtgttatgaccagaccggcctgctcctgcccgttccctgggtgaccaggc gagatctcttgcctctcctcagctccctgggtcacagtcagggtaacacctatctgcctggtatctgcaaaaaccagg ccagagccctaaagtctgattataaggttcaaatcggtttagcggcgtcccggatcctctctgggagtgatcag ggaccgactttactgaaaattagccgctggaaagcagaggatctgggcgtgacttttgcagccagtcactcatgt gcccgtggaccttcggcggtgggacaaaactggaaattaaagcgtgcaggaggcgggtgggagcggaggcgggtggg cggaggcgggtgggtctggaggcgggtgggagtgaggcgggtgggtcaggcgggtgggtgggagcgaagtgaactgg atgagacaggaggaggtctgttcagccaggtcggccatgaagctgtcctgtgtggcctctggcttacccttccga ctattggatgaactgggtccgtcagctcctccgaaaaaggcttggagtgggtggcgagattcggaaacaagccctaca ctacgaaacttactactctgatagtgttaaggccgcttaccatcagctgtgatgactcaaaaagcagcgtttacctgca aatgaacaatctcgtgtcaggacatgggcatctatctacaggtcctactatgggatggattattgggggag gggacttcagttactcctcaaccacgacgccagcggcgaccaccaacaccggcgccaccatcgcgtcga gccccgtcctcgcgccagggcgtgcccggccagcggggggggcgaagtgcacacgagggggcgtggacttcg cctgtgatctacatctgggcgcccgtggcgggacttgggggtcctctcctgactggtatcaccttactgcaa acggggcagaagaactcctgtatataatcaacaaccattatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggc tgtagctgccgattccagaagaagaaggaggtgtaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccc ccgctacaagcaggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttggac aagagacgtggccgggacctgagatgggggaaagccgagaaggaaaccctcaggaaggcctgtacaatga actgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgaagcgggaggggcaaggggc acgatggccttaccagggtctcagtagaccaccaaggacacctacgacgcccctcactcagggcctgcccctc gctaatcgcacaatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggtattcttaactatgttctctttacgctat gtggatacgtgcttfaatgccccttctatcgtctattgcttccggtatggcttcttctcctccttataaatcctggtgc tgtctctttatgaggagttgtggcccgttgcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgttgcagcaacccccactg gtggggcaltgccaccacctgtagctccttccgggacttccgcttccccctcctattgccaccggcgaactcatcg ccgctgcttcccgtgctggacaggggctcggctgttggcactgacaaffccgtggtgttgcggggaagctga cgtccttccatgctgctcgtgcttggccacctggatctcgcgggacgtccttctgctacgtcccttccgcccctca atccagcggaccttccctccgcccgtcgtcggcctctcggccttccgcttctcgccttccctcagacgagt cggatcctcttggccgcccctcccgcctggaatcagagctcgggtaccttlaagaccaatgacttacaaggcagctgta gatcttagccacttttfaaaagaaaagggggactggaagggttaattcactccaacgaagacaagatcgtcttttgc ttgactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctcggctaaactagggaaaccactgcttaagcctca ataaagcttgccttgaagctcaagtagtgtgtgccctgctgtgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttt agtcaagtgtgaaatctctagcagtagtcatgtcatcttattatcagtttataacttcaaaagaaatgaatcag agagtgaaggaactgtttattgcagcttataatggttacaafaaagcaatagcatcaaaattcacaataaagcatt ttttcactgcattcagttgtgttgggttgcacaaactcaatgtatcttcatgtctgctctagctatcccggcccactcc ggcagttccgcccattctcggcccattggcctgactaattttttattatgagagggccgagggcctcggcctctga gctattccagaagtagtgaggaggcttttggaggcctaggcttctgctcagagacgtaccaattccgcccctatagtgag</p>
--	--

		<p>tcgtattacgcgctcactggccgtcgtttacaacgtcgtgactgggaaaacctggcgtfaccacaactaatcgcctt gcagcacatcccccttcgccagctggcgtaataagcgaagaggccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgag cctgaatggcgaatggcgcgacgcgcctgtagcggcgcaataagcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtg accgctacactggcagcgccttagcgcgcctcttctcgttcttcccttctcgcacagttcgccggcttccc gtcaagctctaaatcggggctccccttaggggtccgatttagtgccttaacggcactcgcaccccaaaaaactgattag gtgatggitcacglagtggccatcgccctgatagacggitlctcgccttggacgttggagtcacgttcttaatagtg actctgttccaactggaacaacactcaacctatctcggctattctttgattataagggattttgccgattcggcctat tggftaaaaaatgagctgattfaacaaaatfaacgcgaatftaacaataatfaacgtttacaattcc</p>
<p>LVEF1a- 4D5Flu- BBZ</p>	<p>2</p>	<p>caggtggcactttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgttttttctaatacatcaaatatgtatccgctcatga gacaataacctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagagtatgagttaacatttccgtgctgccctattcc ctttttcggcattttgccttctgttttctcaccagaacgcgtggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtg cacgagtggttacatgaactggatcacaacgcggtaagatccttgagagtttgcgccgaagacgtttccaatg atgagcacttttaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtaigtacgcgggcaaggaactcggctgccgat acactattctagaatgactgggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaat tatgagtgctgccataaccatgagtgataaactgcggccaactacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagc taaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacca aacgacgagcgtgacaccacgatgctctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaacattactggcgaactactact ctagcttcccgcaacaatfaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggccctccgg ctggctggtttattgctgataaatctggagcgggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggt aagccctcccgtatcgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgag ataggtgctcactgattaagcattgtaactgtcagaccaagttactcatatatactttaattgattaaactcattttta atftaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgctcactgagcgtc agacccgtagaaaagatcaaaggatcttctgagatcctttttctgcgctaatctgctgcttcaacaaaaaac accgctaccagcgggtggtttgttccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggttaactgctcagcagagcgc agataccaaactgtccttctagtgtagccgtatgagccaccctcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgc ctctgtaatcctgtfaccagtggtgctgcccagtgggcagataagctgtcttaccgggttgactcaagacgatagttac cggataaggcgcagcggctcggcgtgaacggggggttctgtgcacacagcccagctggagcgaacgacctacaccg aactgagatactacagcgtgagctatgagaagcgcaccgcttccgaaggagaaaaagcgggacaggtatccggt aagcggcagggctcggaaacaggagagcgcacagggagctcagggggaacgccttggatctttatagctcctgctc gggttccgcacctctgacttgagcgtcgaftttgtgatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaacgccagca acgcggccttttacggttctggccttttctggtccttttctcgcacatgttcttctgcttatccctgattctgtgataa cctgattaccgctttgagtgagctgataaccgctcgcgcagcgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcag gaagcggagagcgcaccaatacgaaccgctctcccgcgcttggccgattcattaatgacgtggcagcaca ggtttccgactggaaaagcgggacgtgagcgaacgaatfatgtgagttgactcactattaggcaccagcgtt acactttatgcttccgctcgtatgtgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgat tacgccaagcgcgcaatfaacctcactaaaggaacaaaagctggagctgcaagctfaatgtatcttatgcaact ctttagtcttgaacatggtaacgatgagtttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattg gtggaagtaaggtgtacgatcgtgccttattaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaa ttgccgcatgacagagatattgtattfaagtccttagctcagatacaataaacgggtctctctggttagaccagatctgacc tgggagctctctggctaactagggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtcctcaagtagtgtgccc cgtctgttgtgactctggttaactagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtgcccccga acagggacctgaaaagcgaagggaaccagagctctctcgcagcaggactcggcttctgaaagcgcgcacggcaa gagcgcagggggcggcactgggtgagtagccaaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagatgggtgcg agagcgtcagtaataagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaattcggftaaggccaaggggaaagaaaa atataaattaaaacatatagtatggcaagcaggagctagaacgattcgcagttaatctggcctgttagaaacatcag aaggctgtagacaataactgggacagctacaacctcctcagaccagatcagaagaacttagatcattatataataca gtagcaacctctattgtgtgatcaaaagatagagataaaagacaccaaggaagcttagacaagatagagggaagag caaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgatctcagacctggaggaggagatagaggacaat tgagaagtgaaattataataataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaaga</p>

	<p>gtgggtcagagagaaaaagagcagtggggaataggagctttgcttctgggftctgggagcagcaggaagcactatg ggcgagcctcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgacagcagagaacaalltgtctga gggctattgagggcgaacagcatctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctg tggaaagatacctaaggatcaacagctcclggggatttgggggtgctctggaaaactcattgaccactgctgtgcctt ggaatgctagtggagtaataatctctggaacagattggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaa caattacacaagcttaatafactccttaattgaagaatcgaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaat tagataaatgggcaagtttgggaattggttaacatacaaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtgga ggcttggtaggttaagaatagtttctgacttctatagtgaaatagagttaggcagggatattcaccaattatcgttccag accacctccaacccgaggggacccgacaggcccgaaaggaatagaagaagaagggtggagagagagacagag acagatccattcgattagtaacggatctgacggtaactttaaagaaaagggggattgggggtacagtgacg gggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaaattacaaaaattcaaaat atcgagcttgcagaatggataaagttaaacaagagaggaaatcttgcagctaatggacctctaggtctgaaaggag tgctcgtgaggctccgggtgccgtgacgtgggagagcgcacatcgcccacagctcccagagaagtggggggagg ggtcggcaattgaaccgggtgcttagagaaagggtggcgcgggggtaactgggaaagtgtgctgtactggctccgc ttttcccgaggggtgggggagaaccgtataatagtgacgtatgcgctgaacgttcttttgcgaacgggttccgc agaacacaggtaaagtgcgctgtgtggtcccgcggcctggcctttacgggttatggccttgcgtgcttgaattac ttccactggctgacgtacgtgattctgacccgagcttgggtggaaagtgggtggagagttcgaggccttgcgctt aaggagcccctcgcctcgtgcttgaattgagggcctggcctgggctgggctgggcccgcgctgcaaatctggtggac cttcgcctcgtctcgtcttctgataagtctctagccattaaaattttgatgacctgctgcgacgctttttctggcaag atagcttgaatcgggccaagatctgcacactggtatctgggtttggggcgcggggggcagcggggcccgtg cgtcccagcgcacatgtcggcgaggcggggcctgagcgcggccaccgagaatcggagcggggtagtctcaag ctggccggcctgctggtgctggtgctgctgcgcggcctgctgaccccgccctggcgggcaaggctggcccggtc ggcaccagttgctgagcggaaaagatggcgcctcccgccctgctgcaaggagctcaaaatggaggacggggcg ctcgggagagcggggcgggtgagtcaccacacaaaaggaaaaggccttccgtcctcagccgtcgttcatgtgact ccacggaglacggcgccgtccaggcactcgtatgltctcagacttltggaglacgctcttaggttgggggga ggggtttatgctgagtggttcccactgagtggtgggagactgaagttagccagcttggcactgatgaattctc cttggaaattgcccctttttagtttgatcttggctcattctcaagcctcagacagtggttcaaaatgttttcttccattcagg gtctgtaggaaattcggtaaccggccgcccggggatccattggccttaccagtgaccgccttgcctcctgctcgcctg tctgctccacgccccaggccggacattcagatgactcagagccctgcttccctgctcgttccagtggtgaccgtg taccattacctgcccgtctctcagagcctggtgactcccagggtaacacctatctgcgggtgatcagcagaaccg ggcaaggcccccgaagtctgattataaggtcttaacggttagtgcggtccgtcaccgcttctcaggtagcgggtcc ggaacagatttacctgacaattagcagcctgcaaccggaagacttcgcaacctattactgccagcagctaccatgt gcccgtgacatttggccagggtactaagggtgagctgaaactgctggagggtggaggaaagcggaggtggaggcagc ggcggtgggggatctggcgggtgggggaaagtggcggtgggggatcaggcggtgggggaaagcgaagtccagctggt ggagagtgagggtgactggtgagccagaggcagcctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg ttactggatgaactgggtccgtcaggcaccaggaaggcctggaatgggtggcgagattcggaaacaagccttaca actacgagacttactacgggatagctgaagggtgcttccacctcagctgacacatcaaaagaacactgtttacct gcaaatgaacagcctgctgagaaagataccgctgcttacttactgcacaggctcttattacggcatggactactggggc cagggfactctggtgaccgttctagtaccacgacgccagcggcgaccaccaaccggcgcccaccatcgcgtc gcagcccctgtcccgcggccagaggcgtgcccggcagcggcgggggggcgcagtgacacagaggggctggact tcgctgtgatatctacatctggcgcccttggccgggacttgggggtccttctcctgctcactggttatcacccttactg caaacggggcagaaagaaactcctgtatataatcaacaaccattatgagaccagtacaaactactcaagaggaagat ggctgtagctgccatttccagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaaattcagcagagagcgcagacg ccccgcgtacaagcagggccagaaccagctctataacgactcaatctaggacgaaagagaggatcagatgtttt gacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaaagccctcaggaaggcctgtaca tgaactgcagaagataagatggcggaggctcactgagatgggatgaaaggcagcgcgggaggggcaagg ggcacgatggccttaccaggggtcactacagccaccaaggacacctacagccttcacatgcagggcctgccc cctcgttaagtgcacaatcaacctctgattacaaaatttggaaagattgactggattcactatgttctcctttacg ctatgtggatacgtgctttaatgcttctgtatctgcttctccgtatggcttcttctcctctgtataaatcctgg ttgctgctctttagaggagttgtggccgtgtcaggcaacgtggcgtgggtgacactgttctgctgacgaacccc</p>
--	--

		<p>actggttggggcattgccaccacctgtcagctccttccgggacttccgcttccccctccctattgccacggcggaaactc atcgccgcctgccttgcctgcctgctggacaggggclcggtgltgggcacigacaallccgtggltgltcggggaag ctgacgtccttccatggctgctcgcctgtgtggccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtccctcggcc ctcaatccagcggaccttccctcccgccctgctgcccggctctgcccctctcccgcttccgcttccgctcagac gagtcggatccttggggccctcccgcttgaattcagctcgggtacctttaaagaccaatgacttacaaggcag ctgtagatcttagccacttttaaaagaaaaggggggactggaagggctaattcactccaacgaagacaagatctgctt ttgcttactgggtctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaaccactgcttaag cctcaataaagcttgcctttagtgcctcaagtagtgtgcccgtctgtgtgactctgtaactagagatccctcagac ccttttagtactgtgaaaaatctctagcagtagtagtcatgcatcttattttagtattataacttgcaaaagaaatgaat atcagagagtgagaggaaactgtttattgacgttataatggttacaataaagcaatagcatcacaatttcacaataa agcatttttactgacttagtgtgtgttgcctcaaacatcaatgtatcttcatgcttggcttagctatcccgccct aactccgccagttccgccatttccgccctatggctgaclaattttttattatgacagaggccgaggccctcggc ctctgagctattccagaagtagtgaggaggcttttggaggcctaggctttgctcagacgtaccaatcggcctat agtgagtcgtattacgcgcgctcactggcctctgtttacaacgtcgtgactgggaaaacctggcgttaccacttaa tcgcttgcagcacatcccccttccgagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgccttccaacagtt gcgcagcctgaatggcgaatggcgcgacgcctctgtagcggcgaatagcggcgggtgtgtgtgttacgcg cagcgtgaccgctacacttccagcgccttagcggcctcttctccttctccttctccttctccttctccttctcctt cttccccgtaagctctaaatcgggggctcccttaggggtccgatttagtgccttaccggcactcagccccaaaaact gattagggtgatggtcacgtagtgggccatcgcctgatagacggttttccctttagcgttggagtccactgtcttta atagtgactctgttccaaactggaacaactcaaccctatctcggctctattctttgattataagggttttgcgattt ggcctattggttaaaaaatgagctgatttaaaaaattaacgcgaatttaaaaaatataaacgtttacaatttcc</p>
<p>LVEF1a- 4M5.3- BBZ</p>	<p>3</p>	<p>aggtggcactttcggggaatgtgcgcggaaccctatttgttttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatga gacaataaccctgataaatgcttcaataatagaaaaggaagagtagtattcaacatttccgtgctgccttattcc ctttttgcggcatttgccttctgttttgcaccagaaacgctggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtg cacgagtggttacatcgaactggatcacaacgcggtgaagatccttgagagtttcccccgaagaacgtttccaatg atgagcactttaaagtctgctatgtggcgcggtattatccgattgacgcgggcaagagcaactcggctcggcctat acactattctcagaatgacttgggtgagtagctaccagtcacagaaaagcattctacggatggcatgacagtaagagaat tatgactgctgcataaccatgagtgataacactcggccaaacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagc taaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgccttgggaaccggagctgaatgaagccatacca aacgacgagcgtgacaccagatgctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaaactattaactggcgaactactact ctagcttccggcaacaatataagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcctcggccctcggg ctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgggtatcattgcagcactggggccagatggt aagccctcccgtatcgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgag ataggctcctactgattaagcattggaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgatttaaaactcatttta atttaaaaggatctaggatgaagatccttttgaatctcatgacaaaatccctaacgtgagtttctgctcactgagcgtc agacccctgtagaaagatcaaggatcttctgagatccttttctgctgctaatctgctgcttcaacaaaaaac accgctaccagcgggtgtgttgcgggatcaagagctaccaactctttccgaaggtaactgcttcagcagagcgc agataccaaatactgtccttctagtgtagcctgtagtgagccacttcaagaactctgtagcaccgctacataccteg ctctgtaactctgttaccagtggtctgctccagtggtgataagtcgtgcttaccgggttgactcaagacgatagttac cggataaggcgcagcggctgggctgaacggggggtctgtgacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccg aactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagccacgcttccgaaggagaaaggcggacaggtatccggt aagcggcagggctggaacaggagagcgcacagggagcctcagggggaaacgcctggtatctttatagctctgtc gggttccaccctctgactgagcgtcattttgtgatgctcaggggggaggcctatggaaaaacgccagca acgcggccttttacggttctggccttttctgctcactgttcttctgctgtatccctgattctgtggataa ccgtattaccgctttagtgagctgataaccgctcggcagcgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcagag gaagcggaaagagcggccaatacgcacaaccgcttccccgcgcttggccattcattaatgacgtggcacgaca ggtttcccactggaaagcggcagtgagcgcacaactaataatgtgagttagctcactcattaggcaccaccgctt acactttatgcttccggctctgtatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacagcctatgacatgat tacccaagcgcgaattaaccctactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaatgtagctttagcaact ctttagcttgcacatggttaacgatgagttagcaacatgccttacaaggagaaaaagcaccgtgcatgccgattg</p>

		<p>ccacgacgccagcggcgcgaccaccaacaccggcgcgccaccatcgcgtcgcagccccgtccctgcgccagag gctgcccggccagcggcggggggcgcagtgacacagagggggctggacttcgcctgtgatattcatctggcgc cccttggccgggacttgggggctctctctgtcactggfatacacccttactgcaaacggggcagaaagaaactct gtatafatacaacaaccattatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgattccagaag aagaagaaggagatgtgaactgagagtgaagttcagcagagcgcagacgccccgcgtacaagcagggccag aaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtagatgtttggacaagagacgtggccgggacc tgagatggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggc ggagggcctacagtgagattgggatgaaaggcagcgcgggaggggcaaggggacagatggcctttaccagggct cagtacagccaccaaggacacctacagcgccttcacatgcagggcctccccctcgtcaagtcgacaatcaactct ggattacaaaattgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgcctctttacgctatgtggatacgtcttfaatgctt tgtatcatgctattgctcccgtatggcttcaatctctctctgtataaalctggfctgctcttattgaggagttgtggc ccgtgtcaggaacagtggtggtgtgactgtgttgcagcgaacccccactggtggggcattgccaccacctg tcagctccttccgggacttctgcttccccctccctattgccacggcggaaactatcgcgcctgccttcccgcgtctg gacaggggctcggctgtgggcaactgacaattcctggtgtgtcggggaagctgacgtccttccatggctgctcgc tgtgtggccactggattctgcgcgggacgtccttctgtactgctccttcggcctcaatccagcggaccttcttcccgc ggcctgctcggctctgcggccttctccgctctcgccttcgcctcagacgagtcggatccttggggcgcctc cccgcctggaattcagctcggacttcaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatctagccacttttaaaagaa aaggggggactggaagggtcaatcactccaacgaagacaagatctgcttttctgtactgggtctctctggttaga ccagatctgagcctgggagctctctggtaactagggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtctc aagtagtgtgtcccgtctgtgtgactctgtaactagagatccctcagacccttttagctagtggtgaaatctctag cagtagtagttcatctattatctagattataactgcaaaagaaatgaatcagagagtgagaggaactgtttatt gcagctfataatggttacaataaagcaatagcatcacaatttcacaataaagcaatttttcactgcattctagtgtgt ttgccaactcaatgtatcttcatgtctggctctagctatcccgccctaaactccgccagttccgccattctccg ccccatggctgactaattttttattatgcagaggccgaggccgcctcggcctctgagctattccagaagtagtgagga ggctttttggaggccctaggcttttgcgtcgagacgtaccaatcgcctatagtgagctgattacgcgcgctcactgg ccgtcgtttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttaccctcaatcgccttgcagcacatcccccttcccca gctggcgtaatagcgaagaggccccgaccgatcgccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcga cgcgcctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgcagcgc ctagcggcctccttctccttctccttctcctcgcacgctcggccttccccgcaagctcaaatcgggggct ccctttagggctccgatttagtctttacggcaccctcgaacccaaaaacttgattagggtaggttccagtagtggg atcggcctgafagacgggttttcccttgcgttggagtcacgctttaaagtaggactcttccaaactggaacaa cactcaaccctatctcgtctattctttgattataagggttttccgatttggcctattggttaaaaaatgagctgattta acaaaaatfaacgcgaatfttaacaaaatfaaacgtttacaattcc</p>
LVEF1a-FITC (E2)-BBZ	4	<p>cagggtggcactttcggggaatgtgcgcggaacccctatttgttattttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatga gacaataaccctgataaatgctcaafaattatgaaaaaggaagatgatagattcaacatttccgtgctgcccttattcc ctttttcgggcattttgccttctgttttctcaccagaaaacgctggtgaaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtg cacgagtggtttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcgccgaagaaactttccaatg atgagcacttttaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgcgggcaagagcaactcggctcggcctat acactattctcagaatgacttgggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaat tatgcagtgtgccataaccatgagtataactgcggccaactactctgacaacgatcggaggaccgaaggagc taaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgcctggtgggaaccggagctgaatgaagccatacca aacgacgagcgtgacaccacgatgctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactaataactggcgaactactact ctagcttcccggcaacaatfaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcctcggcccttccgg ctggctggtttattgctgataaatctggagcgggtgagcgtgggtctcgcggatcattgcagcactggggccagatggt aagccctcccgtatctgtagttatctacacgaggggagtcaggcaactatggatgaacgaaalagacagatcgtgag ataggtgcctcactgattaagcattggttaactgcagaccaagtttactc atataacttttagattgattaaaaactcatttta atttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatccctaacgtgagtttctgttccactgagcgtc agacccctgtagaaaagatcaaggatcttcttagatcctttttctgcgcgtaactctgctgcttcaacaaaaaac accgctaccagcgggtggttttggcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggttaactggctcagcagagcgc agataccaaatactgtccttctagtgtagccgtatgtagccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcg</p>

	<p>ctctgctaactctgttaccagtggtgctgccagtgggcagataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttac cggataaaggcagcggcgggctgaacggggggttcgtgacacagcccagcttggagcgaacacctacaccg aactgagatacctacagcgtgagctatgaaagcggccacgcttcccgaaggagaaaaggcggacaggtatccggt aagcggcagggctcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcttggatctttatagtcctgtc gggttcgccacctctgactgagcgtcgaftttgtgatgctcagggggggcggagcctatggaaaaacgccagca acggcggccttttacggttcctggccttttctggccttttctcacatgttcttctgcgttatcccctgattctgttgataa ccgtattaccgctttagtgagctgataccgctcggcgcagccgaacgaccgagcgcagcagtgagtgagcagag gaagcggaaagagcggccaatacgaaacgctctcccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgaca ggttcccgactggaaaagcgggacgtgagcgaacgaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccaccggctt acactttatgcttccggctcgtatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacagctatgacctgat tacccaagcgcgaattaaccctcactaaagggaaacaaaagctggagctgcaagcttaatgtagtcttatgcaact ctttagtcttgaacatgtaacgatgagttagcaacatgcttacaaggagaaaaagcaccgtgcatgccgattg gtggaagtaagggtgtacgatcgtgccttattaggaaggcaacagacgggctgacatggattggacgaaccactgaa ttgccgcatgacagagatattgattaaagtccctagctcgatacaataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcc tgggagctctctggtaactagggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcctttagtctcaagtagtgtgtgcc cgctctgtgtgactctggaactagagatcccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatccttagcagtgggcgccga acagggacctgaaagcgaagggaaccagagctctctcagcgcaggactcggcttctgaagcgcgcacggcaa gagggcagggggcggcactggtgagtagcggcaaaaatftgactagcggaggctagaaggagagagatgggtcgc agagcgtcagfattaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaatcggftaaggccaggggggaaagaaaa atataaattaaaacatagtagtgggcaagcagggagctagaacgattcgcagftaatcctggcctgtgaaacatcag aaggctgtagacaaactgggacagctacaaccatcccctcagacaggatcagaagaacttagatcattatataataca gtagcaaccctctattgtgtcatcaaaaggatagagataaaaagacaccaaggaaagctttagacaagatagaggaagag caaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgatctcagacctggaggaggagatagagggacaat tggagaagtgaattatataataataaagtatgtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaaga gtggtgcagagagaaaaagagcagtggggaataggagcttggcttgggttctgggagcagcaggaaacactatg ggcgcagcctcaatgacgctgacggtacagggcagacaattatgctgtgtatagtgacgagcagaacaatttctgga gggctattgagggcgaacagcatctgttgaactcacagctctgggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctg tggaaaatacctaaaggatcaacagctcctgggalltggggtgctctgaaaaactcattgaccactgctgtgcctt ggaatgctagtggagtaataaatctctggaacagattggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaa caattacacaagcctaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaat tagataaatgggcaagtttgggaattgggttaacatacaaaattggctgtgtatataaaattatcataatgatagtagga ggcttggtaggttaagaatagttttgctgtactttctatagtagaataagattaggcagggatattaccattatcgttcag accacctcccaaccccgaggggaccgacagggcccgaaggaaatagaagaagaagggtggagagagagacagag acagatccattcgattagtaacggatctcgcaggttaactttaaaagaaaaggggggattgggggttacagtgacg gggaaaagaatgtagacataatagcaacagacatacaactaaagaattcaaaaacaaattcaaaaattcaaaatftt atcgagcttgcaaaatggataaaagtttaaacagagagggaatcttgcagctaattggacctctaggtcttgaaggag tgctCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCA CAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCT AGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGC TCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTA AGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCC CTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGAT CCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGCTT AAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTG GGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCT TTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCT TTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACT GGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCCGCGACGGGGCCCGTGCGTCCC AGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAA</p>
--	---

	<p>TCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCT CGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTC GGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGC AGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTG AGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTC ATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTC TCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATG CGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAG CTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGA TCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCC ATTCAGGTGTGCTGA <i>Aggaattcgggtaccgcggccgcccggggatccatggccttaccagtaccgcc</i> <i>ttgctectgcgctggccttgcgtcctccagccgagggcgCAGGTTT</i>CAGCTGGTTGAGAGCG GAGGCAATCTGGTTCAGCCCGGTGGTAGTCTGCGTCTGTCTTGTGCGGC GTCAGGGTTCAC TTTCCGGTAGTTTTTCAATGAGCTGGGTCCGTCAGGCA CCAGGCGGTGGGCTGGAATGGGTGGCAGGTCTGTCTGCACGTAGCTCC CTGACCCACTATGCAGATAGTGTTAAAGGGCGGTTCACAATTTACGCG ACAACGCTAAGAATAGCGTCTACCTGCAAATGAACTCCCTGCGGGTGC AGGATACCGCAGTGTATTACTGCGCTCGCCGTTCTTATGACTCTAGTGG ATACTGGGGCCATTTTTATAGCTACATGGATGTGTGGGGACAGGGCACT CTGGTGACCGTTTCCGGAGGCGGTGGGTCTGGAGGCGGTGGGAGTGGA GGCGGTGGGTCAAGCGTTCAGCCAGCCGTCTCTGTCAGCGCCGCGC CAGGCCAGAAAGTGACAATTTCTGTTCTGGAAGTACTTCAAACATCGG CAACAATTATGTTTCTGGTATCAGCAGCACCCGGGCAAAGCGCCCAA GCTGATGATTTATGATGTGTCTAAACGTCCAAGTGGTGTTCCTGACCGG TTCAGCGGTTCCAAGTCTGGGAATAGTGCCTCACTGGACATCTCAGGCC TGCAAAGCGAAGATGAGGCGGACTATTACTGCGCAGCTTGGGATGACA GCCTGTCCGAATTTCTGTTCCGGCACCGGGACAAAGCTGACCGTGTGGG Caccacgagccagcgccgaccaccaacaccggcgcccaccategogtcgagccctgtccctgcgcccag aggcgtgccggccagcggcgggggcgcagtgcacacgagggggctggacttgcctgtgatactacatctggg cgccctggccgggacttgggggtccttctctctcactggttacccttactgcaaacggggcagaaagaaactc ctgtatataatcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctccgattccagaa gaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagtcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaagcaggggcca gaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttggacaagagacgtggccgggacc ctgagatgggggaaagccgagaaggaagaacctcagggaaggcctgtacaatgaactgcagaagataagatgg cggaggctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgcggaggggcaaggggcacgatggccttaccagggtc tcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccctcacatgcaggccctgccccctgctaagtcgacaataaacctc tggattacaaaattgtgaaagattgactggattcttaactatgttgcctctttacgctatgtggatagcgtgcttfaatgct ttgatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctctgtataaatcctggttgcctctctttatgaggagtgtgg cccgttgcaggcaacgtggcgtgggtgtgactgtgttgcagcgaacccccactgggtggggcattgccaccacct gtcagctccttccgggacttgccttccccctcctattgccacggcggaaactcagccgctgcttgcctgcccgtgct ggacaggggctcggctgttggcactgacaattccgtgggtgttgcggggaagctgacgtccttccatggctgctgc ctgtgtgccacctggatctgcgcgggacgtcctctgtacgtcccttggccctcaatccagcggacctccttcccg cggcctgctccggctctgcggcctctccgctctcgccttgcctcagacgagtcggatcctcttgggcccgt ccccgctggaattcgagctcggtaacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccacttttfaaaga aaaggggggactggaagggctaattcactccaacgaagacaagatctgcttttgcctgtactgggtctctctggttag accagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaacctgcttaagcctcaataaagcttgcctttagtgctt caagtagtggtgcccgtctgttgtgactctgtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctcta gcagtagtagtcatgtcatctattatcagatltataaactgcaaagaatgaatacagagagttagaggaactgtlta ttgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcaaaattcacaataaagcatttttactgcattctagttgtg gtttgtccaaactcatcaatgtatcttcatgtctggcttagctatcccccccctaactccgcccagttcccccattctc</p>
--	---

		<p>cgccccatggctgactaattttttatfatafcagagggccgaggccgcctcggcctcagctatccagaagtagtgag gaggcttttggaggcctaggctttgctcgcagacgtacccaattcgcctatagtgagctgattacgcgcgctcact ggccgtcgtttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcggtfacccaacttaatcgccttgagcacatcccccttcg ccagctggcgtaatagcgaagaggcccgaccgatgcccttccaacagttgagcagcctgaatggcgaatggcg cgacgcgcctgtagcggcgcaataagcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagc gcctagcgcctcctctccttctccttctccttctccttctcctcgcacagttcgcggcttcccgcaagctcfaaatcggg ggctccctttagggctccgatttagtgccttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggtgatggtcagctagt ggccatcgcctgatagacggttttcgcctttgacgttgagtcacagttcttaatagtgagctctgttccaaactgga acaacactcaacctatctcggctattctttgattataagggaattttccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctg atttaacaaaaatfaacgcgaatttaacaaaaatattaacgtttacaattcc</p>
--	--	---

Tabla 14. Secuencia de nucleótidos del dominio de interacción con la diana (anticuerpos) de interruptores de CAR-EC

NOMBRE	SE Q ID	SECUENCIA
pBADCD19wt	5	<p>aagaaaccaaftgtccatattgcatcagacattgccgtcactgcgtctttactggctcttctcgtcaaccaaacggtaac cctgattattgcacggagtcacactttgctatgccatagcattttatccataagattagcggatcctacctgacgcttttat cgaactctctactgtttctccataaccggtttttgggctagaaataattttgfttaacttaagaaggagaatacatcaacta gtacgcaagttcacgtaaaaagggtatctagagggtgaggtgattttatgaaaaagaatcgcatttctctctgtagcat gttcgtttttctattgctacaaacgcatacgtgacatccagatgacacagactacatcctcctgtctgctctctggga gacagagtcaccatcagttgcaaggcaagtcaggacattagtaaatatttaaaftggtatcagcagaaccagatggaa ctgttaactcctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtcctcaaggtcagtgggcagtgggctggaaca gattattctctaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttccaacagggtataacgcttccgtaca cgttcggaggggggaccaagcttgatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttccggcctctgatga gcagttgaaatctggaactgcctctgtcgtgtgctgctgaataactctatcccagagaggcacaagtacagtggaag gtggataacgccctccaatcgggtaactccaggagagtgacagagcaggacgcaaggacagcacctlacagcc tcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaacaacaaagtctacgctgcgaagtcaccatcaggg cctgtcctcgcctcacaagaagctcaacaggggagagtgtaagctggggatcctctagagggtgaggtgattttat gaaaaagaatacgcatttctctgcatctatgtcgtttttctattgctacaaacgcgtacgctgaggtgaaactgcagg agtcaaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtcgtcactgctcaggggtctcattaccogacta tggtgtaagctggattgccagcctccagaaaagggtctggagtggtgggagtaatatggggtagtgaaccacata ctataatcagctcctcaatccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagtttttaaaaatgaacgctc gcaactgatgacacagccattactactgtgccaacattatfactacgggtgtagctatgctatggactactggggcca aggaaacctcagtcaccgtctcctcagcctccccaaggggcccatcggcttccccctggcaccctcctcaagagcac ctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactactcccgaaccgggtgacgggtgctgtggaactcag gcgccctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcctacagtcctcaggactctactcctcagcagcgtggtga ctgtgccctctagcagcttgggcacccagacctacatctgcaactgcaatcaaacgcccagcaaccacaaaggtggac aagaaagttgagcccaaatctgtgacaaaactcacataataagtcaccgatgccctgagagcctcaaccaggt cagctcctcgggtggcgccgggcatgactatcgtcggcgcacttatgactgtcttcttcatcatgcaactcgtaggaca ggtgccaaacgggtctcagactggctgtttggcggtatgagagaagatttcagcctgatacagattaaatcagaacgca gaagcggctgataaaacagaattgcctggcgagtagcgcgggtggtccacctgaccatgccgaactcagaa gtgaaacgccgtagcggcatggtagtggtgggtctccccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaataaaac gaaaggctcagtcgaaagactgggcttctgtttatctgtttgtcggtaaacgctctcctgagtaggacaaatccgc cgggagcggattgaaactgcaagcaacggccggagggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccagg catcaaatgaagcagaaggccatcctgacggatggccttttgcgttctacaactctttttgttttttctaaatcattca aatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgctcaataatattgaaaaaggagatgagattcaacatt tccgtgtcgccttattcccccttttgcggcattttgcctcctgctttttgtcaccagaaacgctggtgaaagttaaagatg ctgaagatcagttgggtgcacagtggtttacatgaactggatcacaacagcggtaagatccttgagagtttcgccc gaagaacgtttccaatgatgacacttttaaaagtctctatgtggcggggtattatcccgtgtgacggcgggcaagag caactcggctgccgatacactattctcagaatgactgggtgagtaactcaccagtcacagaaaagcactctacggatgg catgacagtaagagaattatcagtgctgccataaccatgagtgataaactgcggccaacttactctgacaacgatcg gaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagct</p>

		<p>gaatgaagccataccaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaaactafaa ctggcgaaactactactctagcttcccggaacaattaatagactggatggaggcgggataaagtgcaggaccactctg cgctcggccctccggctggctggttattgctgataaatctggaaccgggtgagcgtgggtctcgcgggtatcattgcagc actggggccagatggtaagccctcccgtatcgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaa tagacagatcgtgagataggctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttactatatactttagattg atftaaaactctattftaattftaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgaccaaaaatccctaacgtgatt tcgtccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaaggatcctctgagatcctttttctgctgtaactctgctgctt gcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggttgttggccgatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactg gcttcagcagagcgcagataccaatactgtccttctagttagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagca ccgctacatacctcgtctgtaactctgtaccagtggtgctgctccagtgggcgataagtcgtgcttaccgggtggac tcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacggggggtcgtgcacacagcccagctggagc gaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaagcggccacgctcccgaagggaagaaggc ggacaggtatccggtaagcggcagggcggaaacaggagagcgcacgagggagctccaggggggaaacgcctggt atcttatagtctgtcgggttccgcccctctgactgagcgtcattttgtgatgctcaggggggagcggagcctatg gaaaaacccagcaacgcggcccttttaccggtcctggtcctttgtgctgcttttctcacatgcttcttctgcttacc ctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcggcagccgaacgaccgagcgcagc agtcagtgagcggaaagcggaaagagcgcctgtagcggatfttctcttaccgcatctgtcgggtatttccaccgcata tgggtcactctcagtaaatctgctctgatgccgatagtaagccagatatacctccgctatcgtacgtgactgggtca tggctgcgcccgcacaccgccaacaccgctgacgcgcccctgacgggcttctgctcctccggcatccgcttacaga caaactgtgaccgtctccggagctgcatgtgtagaggtttaccgctatccgaaacgcgcgagggcagcagatc aatcgcgcggaaggcgaagcggcagcagataatgtgctgcaaatggagcgaagcagggattctgcaaacctatg ctactcgtcaagccgtaattgtctgattcgttaccattatgacaactgacggctacatcattcattttctcacaacc ggcacggaactcgtcgggctggcccggctgatttttaataaccgcgagaaatagattgatcgtcaaaaccaac attgacgaccgaggtggcagataggcatccgggtgggtctcaaaagcagcttcgctgctgatacgttggctcctcgc ccagcttaagacgtaatccctaactgctggcggaaaagatgtgacagacgcgacggcgacaagcaaacatgctgtg cgacgtggcgatacaaaattgctgctgcccaggtgacgctgactgataagcctcgcgtaccggattatccatc ggtggatggagcagctgtaactcgttccatgcccgcagtaacaattgctcaagcagattatccagcagctccg aatagcgccttcccctgcccggcgtaatgattgccaaacaggctcgtgaaatcgggctgggtgccttcatccgg gcaagaagaacccgtattgcaaatattgacggccagtaagccattcatgccaagtagggcggcggagcaaaagtaa cccactggtgataccattcgcgagcctccggatgacgaccgtagtgatgaatctctcctggcgggaaacagcaaaat caccggctggcaaaacaaattctgctcctgattttaccaccctcaccgcaatggtgagattgagaatataacctt tcattcccagcggctggtcgataaaaaatcgagataaacggtggcctcaatcggcggttaaacgccaccagatggg cattaacagagatccggcagcaggggatcttttgcgctcagccatactttcactcctccgcccattcagag</p>
<p>pBAD-CD19 LS202X mt</p>	<p>6</p>	<p>aaagaaccaattgtccatattgcatcagacattgccgctactgcgcttttactggctctctcgtcaaccaaacggtaac cctgattattgacggagtcacactttgctatgccatagcattttatccataagattagcggatcctactgacgcttttat cgaactctactgtttctccatacccgtttttgggctagaataattttgttaacttfaagaaggagaatacatcaacta gtacgcaagttcacgtaaaaagggtatctagaggttgaggtgattttgaaaaagaatatcgcatttctctgtagcat gttcgtttttctattgctacaaacgcatacgtgacatccagatgacacagactacatcctcctgctgctcctctgga gacagagtcaccatcagttgacgggcaagtcaggacattagtaaatattaaattggatcagcagaacacagatggaa ctgtfaaacctctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtcaccatcaagggtcagtggtgctggaaca gattattctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttactttgccaacagggtaatacgttccgtaca cgttcggaggggggaccaagcttgagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatctccgccatctgatga gcagttgaaatctggaactgcctctgctgctgctgctgaataacttctatcccagagagccaaagtacagtggaag gtggataacgcccataatcgggtaactccaggagaggtgcacagagcagcagcaaggacagcaccctacagcc tcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaacacaaagtctacgctgcgaagtcaccatcaggg cctgTAGtgcgccgtcacaagagcttcaacaggggagaggttaagctggggatcctctagaggttgaggtgattt tatgaaaaagaatatcgcatttctctgcatctatgttctgttttctattgctacaaacgcgtagcgtgaggtgaaactgca ggagtcaggacctggcctggtggcgcctcacaagcctgtccgtcatgactgctcaggggtctcattaccgga ctatggtgtaagctggatccagcctccacgaaagggtctggagtggtggggagtaatatggggtagtgaaccac atactataattcagctctcaaatccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagtttcttaaaatgaacag</p>

	<p>lctgcaaaactgatgacacagccatttactactgtgccaacattattactacgggtggtagctatgctatggactactgggg ccaaggaacctcagtcaccgtctcctcagcctccaccaaggggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagag cacctctgggggacacagcgccctgggctgctggtcaaggactactccccgaaccgggtgacgggtgctggaact cagggccctgaccagcggtgacacacttccggctgtcctacagtcctcaggactctactcctcagcagctgg tgactgtccctctagcagcttgggacccagacctacatctgcaacgtgaatcaaacgccagcaaccaaggtgg acaagaaagttagcccaaatctgtgacaaaactcacacataataagtcgaccgatgccttgagagccttcaacca gtcagctccttccgggtgggctggggcgtgactatctgctgcccacttatgactgtcttctttatcatgcaactcgtagga caggtgccaacgggtctccagcttggctgtttggcggatgagagaagatttcagcctgatacagattaatcagaacg cagaagcggtctgataaaacagaattgctgctggcggcagtagcggtgggtcccactgacctatccggaactcag aagtgaacggcctgtagcggcagtgtagtggggctccccatgagagtaggggaactgccagcacaataaaa acgaaaggctcagtcgaaagactgggcttctgtttatctgttggcggtaacgctctcctgagtaggacaatcc ggcgggagcggattgaaactggaagcaacggccggaggggggcaggacggccataaaactgcca ggcatcaaaltaagcagaaggccatctgacggatggccttttgcgtttctacaactcttttgtttatcttaatacatt caaatatgtatccgctcatgagacaataacctgataaatgtctcaataatattgaaaaaggaagatgagattcaac attcctgtgctgcccatttcccccttttggcggcatttgccttctgttttgcctaccagaacggctggtaaaaga tgctgaagatcagttgggtgacagagtggtttacatcgaactggatctcaacagcggttaagatcctgagagtttcc ccgaagaacgfttccaatgatgagcacttttaaggctctgctatgtggcgggtattatcccgtgttgacggggcaag agcaactcggctgcccatacactattctcagaatgacttgggtgagtagtaccagtcacagaaaagcatcttacggat ggcatgacagtaagagaattatgacgtgctccataaccatgagtgataaactcggccaacttactctgacaacga tcggaggaccgaaggagtaaccgctttttgcaacatgggggatcgttaactgccttgatcgttgggaaccgga gctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaaacggttgcgcaactatt aactggcgaactactactctagcttccggcaacaattaatagactggatggaggggataaagttgacaggaccactt ctgctcggccctccggctggtgttattgctgataaatctggagccggtagcgtgggtctcgcggtatcattgc agcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtatgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacg aaatagacagatcgtgagataggctcactgattaagcattggtaactgacagcaagtttactcatatatactttag attgattaaaactcatttttaattaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgaccaaaatccttaacgta gttttcttccactgagcgtcagaccctgtagaaaagatcaaggatcttcttgatccttttctgcccgtaatctgct gcttgcacaacaaaaaacaccgctaccagcgggtggttgggtccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggta actggctcagcagagcagatacacaatactgctctctagtagcggtagttagggccaccactcaagaactctgt agcaccgctacatacctcgtctgtaactctgttaccagtggtgctgctccagtgggcagataagtcgtgttaccgggtt ggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctggaacggggggtcgtgacacagcccagcttg gagcgaacgacctacaccgaactgagatactacagcgtgagctatgagaaaagcggcagcttcccgaaggagaa aggcggacaggtatccgtaagcggcagggctggaacagagagcgcagcaggggagcttccagggggaaacgc ctggatctttatagctctgctgggttccaccctctgactgagcgtcattttgtgatgctcagggggggcggagc ctatggaaaaacgccagcaacggcggccttttaccggcttctgctgctgctgctcagggggggcggagc tcccctgattctgtgataaacctgattaccgctttagtgagctgataaccgctcggcagcggcaacgaccgagcga gagtagtcagtgagcaggaagcgggaagagcgcctgatgcgggttttctccttacgcatctgtgctgatttcaaccg cataatggctcactcagtaaatctgctctgatgcccagatgtaagccagatacactccgctatcgtactgactgg gtcatggctgccccgacacccgcaacacccgctgacgcgcctgacggctgtgctgctcccggcatccgctta cagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagagggtttaccgctatcaccgaacgcgcgaggcagc agatcaatcgcgcgcaagcgaagcggcatgataatgtgctgtcaaatggcgaagcagggattctgcaaac ctatgctactccgtcaagccgtcaattgctgattcgttaccataatgacaactgacggctacatcattcttctcac aacggcacggactcgtcgggctggccccggctgatttttaataaccgagaaatagagttgatctcaaac caacattgcgaccgagcgtggcagataggcatccgggtggtgctcaaaagcagcttgcctggctgatacgttggctc cgcgccagcttaagacgctaatccctaactgctggcggaaaagatgtgacagacgcgacggcgacaagcaaacatg ctgtgcgacgtggcagatcaaaattgctgctgctgaggtgatcgtgatgactgacaagcctcgcgtaccgattat ccatcgggtgagggagcagactcgttaatcgtctccatgcccgcagtaacaattgctcaagcagattatcgcagcag ctccgaatagcggccttcccctggccggcgttaattgattgcccacaacaggtcgtgaaatggcgtggtgcttcat ccgggcaagaaccccgtattggcaaatattgacggccagtaagccattcatgcagtagggcgcggacgaaag taaaccactggtgatacattcgcgagcctccggatgacgaccgtagtgatgaaatctctctggcgggaacagcaaa atataccccggcggcaaacaaatctctgctccctgattttaccacccccctgaccggcaatggtagattgagaataa ccttcaatccagcggctggctgataaaaaatcagataaccggtggcctcaatcggcgtfaaacccgccaccagat gggcattaaacgagtatccggcagcaggggatcatttgcgctcagccatactttcactcccgcattcagag</p>
--	---

<p>pBAD-CD19 HK136X mt</p>	<p>7</p>	<p>aagaaccaattgtccatattgcatcagacattgccgtcactgcgtctttactggctctctcgtaaccaaacggtaac cctgattatttgcacggagtcacactttgctatgccatagacattttatccataagattagcggatcctacctgacgctttt cgcaactctctactgtttctccataccggtttttgggctagaaataatttgttaactttaagaaggagaatcatcaacta gtacgcaagttcacgtaaaaagggtatctagaggtgaggtgattttatgaaaaaatatcgatttctctgtagcat gttcgtttttctattgctacaaaacgcatacgtgacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgccctctgga gacagagtcaccatcagttgcaggccaagtcaggacattagtaaatattaaattggtatcagcagaaccagatggaa ctgttaaactcctgatctaccatacatcaagattacatcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtggtctggaaca gattattctctaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttccaacagggtaatacgttccgtaca cgttcggaggggggaccaagctfagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtctcatctcccgccatctgatga gcagttgaaatctggaactgcctctgtctgtgctgctgaataactctatcccagagaggccaaagtacagtggaag gtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggagaggtgcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcc tcagcagcacctgacgctgagcaaaagcagactacgagaacaacaagctctacgctgcgaagtcaccatcaggg cctgtcctcggcgtcacaagagctcaacaggggagaggttaagctggggatccttagaggtgaggtgattttat gaaaaagaatatcgacttctctgcatctatgtctttttctattgctacaaaacgcgtacgctgaggtgaaactgcagg agtcaggacctggcctggggcgcctcacagagcctgtccgtcacatgcaactgtctcagggtctcaiffaccgacta tgggttaagctggattgccagcctccacgaaagggtctggagtggtgggagtaatatggggtagtgaaccacata ctataatcagctctcaatccagactgaccatcataaggacaactccaagagccaagttttctaaaaatgaacagct gcaaacctgatgacacagccatttactctgtccaacattattactacgggtgtagctatgctatggactactgggcca aggaacctcagtcaccgtctcctcagcctccaccaaggggccatcggtcttcccctggcaccctctccTAGagc acctctgggggcacagcggcctgggctgcctggtcaaggactacttcccgaaccggtgacggtgtcgtggaactc aggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagfctcaggactctactcctcagcagcgtgt gactgtccctctagcagcttgggcaaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaaccaaggtgg acaagaaagttgagccaaatctgtgacaaaactcacataataagtcgaccgatgccctgagagcctcaaccca gtcagctcctcgggtggggcgggcatgactatcgtcgcgcacttatgactgtcttcttcatcgaactcgttagga caggtgcaaacggctccagcttggctgtttggcggatgagagaagattttagcctgatacagattaaatcagaacg cagaagcggctgataaaacagaatttgcctggcggcagtagcgcgggtgccacctgacccatgccgaactcag aagtgaaacgccgtagcgcctgatgtgtggggtcctccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaataaaa acgaaaggctcagtcgaaagactgggcttctgtttatctgtgtttgtcgggtaacgctctcctgagtaggacaatcc gccgggagcggatftgaaactgtcgaagcaacggcccggagggtggcggcaggacgccgcataaaactgcca ggcatcaaaltaagcagaaggccatcctgacggatggccttttgcgttctcaaaactcttttgttatttttaatacatt caaatatgtatcgcctcatgagacaataacctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagatfatgagtaftcaac atttccgtgtcgccttattcccctttttgcccattttgcttctctgtttttgctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaaga tgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggtatcacaacagcggtaagatccttgagagtttcc ccgaaagacgtttccaatgatgagcacittaaaagttctglatgtggcgcggtattatcccgtgtgacgccgggcaag agcaactcggctgccatatactattctcagaatgactggttgagfactcaccagtcacagaaaagcatcttacggat ggcatgacagtaagagaattatgagtgctgccataaccatgagtgataaactgcggccaacttactctgacaacga tcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccgga gctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccagatgcctgtagcaatggcaacaacggtgcaactact aactggcgaactacttactctgcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttcaggaccactt ctgcgtcggccttccggctggtgtgtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgc agcactggggccagatggtaaaccctcccgtatcgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacg aaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggttaactgacagcaagtttactcatatactttag attgatitaaaacttatttttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtga gtttctgtccactgagcgtcagaccctgagaaaaagatcaaaggatcttctgagatcctttttctgctgctaatctgct gcttgcacaacaaaaaacaccgctaccagcgggtgtgtttgtccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtg actggctcagcagagcgcagatacacaatactgtccttctagtgtagccgtagttagccaccacttcaagaactctgt agcaccgctacatacctcgtctgtaactctgttaccagtggtgctgccagtgccgataagtcgtgtcttaccgggt</p>
--------------------------------	----------	---

		<p>ggactcaagacgatagtfaccggataaggcgcagcggctgggctgaacggggggtctgacacagcccagcttg gagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaagcggccacgcttcccgaaggagaa aggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcacgaggagcttcagggggaaacgc ctggatctttatagctctgctgggttccacacctgacttgagcgtcgattttgtgatgctgctcaggggggcggagc ctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggctctgcccctttgctggcctttgctcacatgtcttctcgcgta tcccctgattctgtggataaccgtattaccgccttgagtgagctgataccgctgcccgagccgaacgaccgagcgcga gagctcagtgagcggagaaagcggaaagagcgcctgatgcggatftttctcttacgcatctgtcgggtattcacaccg catatgggtcactctcagtacaatctgctctgatgcccatagtaagccagtatacactccgctatcgtcactgactgg gtcatggctgcgccccgacacccgccaacaccccgctgacgcgccctgacgggcttctgctcccggcatccgctta cagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagagglttaccgctcatcaccgaaacgcgagggcagc agatcaattcgcgcggaagcgaagcggcatgcataatgtgcctgtcaaatggacgaagcagggtctgcaaac ctatgctactccgcaagccgcaattgtctgattcgttaccgaattatgacaacttgacggctacatcattcattttctac aacggcacggaactcgtcgggctggccccggtgcatfttttaataaccgcggaataagagtgatcgtcaaac caacattgcgaccgacggtggcgataggcatccgggtgggtcctaaaagcagcttcgctggctgatacgttggctc cgcgccagcttaagacgctaatccctaactgctggcggaagagatgtgacagacgcgagcggcgaacgaaacatg ctgtgcgacgctggcgatatcaaaatgtctgtcggcagggtgatcgtgatgactgacaagcctcgcgtaccgattat ccatcgggtggatggagcgcactcgttaatcgttccatgcgcgcgagtaacaattgctcaagcagattfatcgcgagcag ctccgaatagcgccttccccttggccggcgttaattgattgcccacagctcgtgaaatgcggctggctcgtctcat ccggggcgaagaaccccgtattggcaaatfagcggccagtttaagccattcatgcccagtaggcgcggcggacgaaag taaaccactggtgatacattcgcgagcctccggatgacgaccgtagtgatgaatctctcctggcgggaacagcaaa atatcaccggctggcaaaacaattctcctcctgattttaccaccccctgaccgcgaatggtgagattgagaataaa cctttcattcccagcggctggcgataaaaaaatcgagataaccggtggcctcaatcggcgttaaacccgaccagat gggcattaaacgagatcccggcagcaggggatctttgctgctcagccatactttcactaccgccattcagag</p>
<p>pBAD-CD19 LS202/H K136X mt</p>	<p>8</p>	<p>aagaaaccaattgfcacatfagcacfagacattggcgtcactgcgctffactggctctctcgtcaaccaaacggtaac cctgattattgacggagtcacactttgctatgccatagcattttatccataagattagcggatcctacctgacgctttat cgcaactctactgtttctccataccggtttttggcgtagaaataattttgtaacttaagaaaggagaatacatcaacta gtacgcaagltcacgtaaaaagggtatctagagggtgagggtatfttalgaaaaagaatatacgcatttctctgtagcat gttctgtttttctattgctacaaacgcatacgtgacatccagatgacacagactacatcctcctgtctcctctctggga gacagagtcaccatcagltgacggcaagtcaggacattagtaaatattaaattggtatcagcagaacccagatggaa ctgttaaacctctgactaccatacatcaagattacactcaggaggtccatcaagggtcagtgggcagtggtctggaaca gattattctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccactacttttggcaacagggtatacgttccgtaca cgttcggaggggggaccagcttgatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatctcccgcacatctgatga gcagtgaaatctggaactgcctctgtcgtgtgctgtaataacttctatccagagagccaaagtacagtggaag gtggataacgcctccaatcgggtaactccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcactacagcc tcagcagcaccctgacgctgagcaagcagactacgagaacacaaagtctacgctgcgaaagtcaccatcaggg cctgTAGcggccgtcacaagagctcaaacagggagaggttaagctgggatcctctagagggtgaggtgattt tatgaaaaagaatatacgcatttctctgcatctatgtctgtttttctattgctacaaacgcgtacgctgaggtgaaactgca ggagtcaggacctggcctggtggcgcctcagagcctgtcgcgtcacatgactgtctcaggggtctcattaccgga ctatggtgfaagctggattcggcctccacgaaagggtctggagtggtgggagtaaatggggtagtgaaaccac atactataattcagctctcaaatccagactgacctatcaaggacaactccaagagccaagttttctaaaaatgaacag tctgcaactgatgacacagccattactactgtgcaaacattactacgggtgtagctatgctatggactactgggg ccaaggaacctcagtcaccgtctcctcagcctccaccaagggccatcggcttcccctggcaccctctccTAG agcaccctctggggcagcagcggcctgggctgctggtcaaggactacttcccgaaccgggtgacggtgctggtgga actcagggcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgctctacagctcctcaggactctactcctcagcagcg tggtagctgtgccctctagcagcttgggcacccagacclacatctgcaacgtgaatcacaagcccaacccaagg tggacaagaaagttgagccaaatctgtgacaaaactcacacataataagtcgaccgatgcccttgagagccttcaac ccagtcagctccttccgggtggcgcggggcatgactatcgtcggcacttatgactgtctctttatcatgcaactcgtg ggacaggtgcaaacggtctccagcttggctgttttggcgatgagagaagatttcagcctgatacagattaaatcaga acgcagaagcggctctgataaacaatgtcctggcggcagtagcgggtggtcccactgaccatgcccgaact cagaagtgaacgcggtagcggcatggtatgtgtgggtctccccatgcgagatagggaactgcccaggcatcaaat</p>

		<p>aaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcttctgtttatctgttfttgcggtaacgctcctcctgagtaggacaaa tccgccgggagcggatfttgaaagctgcgaagcaacggcccgagggtggcgggagggagcggccgcataaactgc cagggatcaaataagcagaaggccatctcagcgatggccttttgcgtttctacaactcttttgttttcttaatac atcaaatatgtatccgctcatgagacaataacctgataaatgttcaataatattgaaaaaggagatgatgattca acattccgtgctgccctfcttcttttggcgatfttgccttctgttttgcaccagaaacgctggtgaaagtaaaa gatgctgaagatcagttgggtgcacagtggtttacatcgaactggatcacaacagcggtaagatcctgagagtttgc ccccgaagaacgtttccaatgatgagcactttaaagtctgtatgtggcgggtattatcccggtgtgacgcccggca agagcaactcggctcgcgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtagctaccagtcacagaaaagcatcttacgg atggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgcataaaccatgagtgataaactcggccaacttactctgacaac gatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccg gagctgaatgaagccatacaaacgacgagcgtgacaccacgatgctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaac attaactggcgaactacttactctagcttccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaaagtgcaggacca cttctgcgctcggcccttccggctggctgggttattgctgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgggtatcatt gcagcactggggccagatggtaagccctccgtagctagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaa cgaatagacagatcgtgagataggtgctcactgattaagcattgtaactgtcagaccaagttactcatataacttt agattgattaaaactcatttttaattaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatccctaacgt gagtttctgctcactgagcgtcagaccctgtagaaaagatcaaaagatcttctgtagatcctttttctgcgctaactctg ctgctgcaaacaaaaaaccaccgctaccagcgggtgggtttgttggcgatcaagagctaccaactcttttccgaagg taactggctcagcagagcgcagatacaaaactgtccttctagttagcctgtagccagtaggaccaccactcaagaactct gtagcaccgctcatatctcgtctgtaactcctgtaccagtgctgctgcaagtggcgataagtcgtcttaccgg gttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaaccgggggttcgctgcacacagcccagc ttggagcgaacgacctacaccgaactgagatactacagcgtgagctatgagaaagcggcaccctccgaaggga gaaaggcggacaggtatccgtaagcggcagggctggaaacaggagagcgcacgagggagctcaggggggaaa cgctggtatctttagctctgctgggttccgaccctctgactgagcgtcgatftttgtgatgctgtaagggggcgg agcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttaccggttctgcttggccttttgccttttgcacatgtcttctgc gttaccctgattctgtaggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataaccgctcggcagccgaacgaccgagc gcagcagtgatgagcggaggaagcggagcggctgagtgaggtatttctccttacgcatctgtgctggtatttcaca ccgcatatggtgactctcagtaaatctgctctgagcgcagatgtaagccagatatacctcctctacgtgactgac tgggtcatggctgcgcccgcacaccgccaacaccgctgacgcctgacgggcttgcctcctcggcatccgc ttacagacaagctgtgaccgtctcgggagctgcatgtgtcagaggtttaccgctacaccgaaacgcgcgaggca gcagatcaattcgcgcgcaaggcgaagcggcatgcataatgtgcctgtcaaatggacgaagcagggattctgcaaaa ccctatgtactccgtcaagccgtcaattgtctgattcgttaccataatgacaactgacggctacatcattcattttctc acaaccggcagcggaaactcgtcgggctgcccgggtgcattttaataaccggagaaaatagagttgatcgtcaaaa accaacattgcgaccgagggctgagtaggcacccgggtggtgctcaaaagcagcttgcctgctgatacgttggctc ctcgcgcagcttaagacgtaaacctactgctggcggaaaagatgtgacagacgcgacggcgacaagcaaacat gctgtcgcagcgtggcgatacaaaaattgctgtctccaggtgatcgtgatgactgacaagcctcgcctaccgatta tccatcgggtgatggagcactcgttaatcgttccatcgcgcagtaacaattgctcaagcagattatcgcagcag ctccgaatagcggccttcccttcccggcgttaattgccccaaacaggtcgcgtaaatgcggctggtgccttcat ccggcgaaaagaaccctgattggcaaatattgacggccagttaagccattcatccagtaggcgcgagcgaag taaaccactggtgataaccattcgcgagcctccggatgacgaccgtatgtaaatctcctcggcgggaacagcaaa atatcaccggctggcaaaacaattctgctcctgattttaccaccctgaccgcgaatggtgagattgagaatataa cctttcattcccagcggctggctgataaaaaatcgagataaccggtggcctcaatcggcgtaaacccgcccacgat gggcattaaacgagtatccggcagcaggggatcatttgcgcttcagccatactttcatactcccgcattcagag caggtggcacttttccgggaaatgtgcgcggaaccctatttgttattttctaaatacattcaaatatgatacctcatga gacaataaccctgataaatgtctcaalaatattgaaaaaggaagatgagtagtattcaacatttccgtgtcgccttattcc ctttttgcgcattttgccttctgttttgcaccagaacgctggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtg cacgagtggtttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcggcgaagaacgtttccaatg atgagcactttaaagttctgtatgtggcgcggtattatccgattgacggcgggcaagagcaactcggctcgcgc acactattcagaatgacttgggtgagtagctaccagtcacagaaaagcatctacggatggcatgacagtaagagaat tatgcagtgctgcataaaccatgagtgataaactcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagc</p>
<p>LV-EF1a- CD19(FMC63) -BBZ</p>	<p>9</p>	<p>caggtggcacttttccgggaaatgtgcgcggaaccctatttgttattttctaaatacattcaaatatgatacctcatga gacaataaccctgataaatgtctcaalaatattgaaaaaggaagatgagtagtattcaacatttccgtgtcgccttattcc ctttttgcgcattttgccttctgttttgcaccagaacgctggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtg cacgagtggtttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcggcgaagaacgtttccaatg atgagcactttaaagttctgtatgtggcgcggtattatccgattgacggcgggcaagagcaactcggctcgcgc acactattcagaatgacttgggtgagtagctaccagtcacagaaaagcatctacggatggcatgacagtaagagaat tatgcagtgctgcataaaccatgagtgataaactcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagc</p>

	<p>faaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccctgacgttgggaaaccggagctgaatgaagccatacca aacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactactact ctagcttcccggcaacaaltaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggccctccgg ctggctggttalttctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcatlgcagcactggggccagatggt aagccctcccgtatcgtatgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgag ataggtgcctcactgaffaagcattggaactgtcagaccaagttaactatataactttagattgattaaaactcatttta atftaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgaccaaaatccctaacgtgagtttctgctcactgagcgtc agaccccgtagaaaaagatcaaaggatctcttgagatcctttttctgcgcgtaactctgctgctgcaaaaaaaacc accgctaccagcgggtggttgggtccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggaactggctcagcagagcgc agataccaaatactgtccttctagtgtagccgtatgagccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatactcgc ctctgctaactctgttaccagtgctcgtccagtgggcagataagtcgtcttaccgggtggactcaagacgatagttac cggataaggcgcagcggctgggtgacgggggtctgctgacacagccagcttggagcgaacgacctaaccg aactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggccacgctcccgaaggagaaaaggcggacaggtatccggt aagcggcagggctcggaacagagagcgcacagggagcttcaggggaaacgctggtatctttatagctctgct gggttccaccctctgactgagcgtcgtattttggatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacggcagca acgcgcccttttacggctctggccttttctgctccttttctcagatgttcttctgcgcttaccctgattctgtgataa ccgtattaccgctttagtgagctgataaccctcggcagccgaaccgagcgcagcagctgagctgagcagcag gaagcggagagcggcaaacacgcaaacccctctcccgcgcttggccgattcattaatgagctggcagcagaca ggtttccgactggaagcgggacagtgagcgaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccaccagcttt acactttatgcttccgctcgtatgttgggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacagctatgacatgat tacgccaagcgcgcaattaacccctactaaagggaaacaaaagcgtggagctgcaagcttaatgtatgcttatgcaact ctttagtcttgcacaatggtaacgatgagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattg gtggaagtaaggtggtacgactgcttattaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaa ttcggcattgcagagatattgatttaagtgcttagctcgatacaataaacgggtctctggttagaccagatctgagcc ctgctgttctgactctgtaactagagatccctcagacccttttagtcagctgtggaaaatctctagcagctggcggcga acagggactgaaaagcgaagggaacacagagctctcagcagcagactcggcttctgtaagcgcgcacggcaa gagcgcagggcgcgactggtgagfacgcaaaaaatlltgaactagcggaggtagaaggagagatgggtgog agagcgtcagtaataagcgggggagaatlagatcgcgatgggaaaaatcggftaaggccagggggaaagaaaa ataataaataaacatagatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttatctggcctgttagaacaatcag aaggctgtagacaafactgggacagctacaacatccctcagacagagatcagaagaacttagatcattatataataca gtagcaaccctctattgtgtcatcaaggatagagataaaagacaccaggaagctttagacaagatagaggaagag caaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgacttccagacctggaggagagataggggacaat tggagaagtgaattataataataaagtagtaaaaatgaaccattagagtagcaccaccaagcgaagagaaga gtggtgcagagagaaaaagagcagtggggaataggagctttgtccttgggtcttgggagcagcaggaagcactatg ggcgcagcctcaatgacgctgacggtaacagccagacaattattctgtatagtgagcagcagacaacaattgctga tggaaagatacctaaaaggatcaacagctcctggggattgggggtgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtcctt ggaaatgctagtggagtaataatctctggaacagattggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaatfaa caattacacaagccttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaagaaatgaacaagaattattggaat tagataaatgggcaagttgtggaattggttaacataacaaatggctgtggtatataaaatattcataatgatagtagga ggcttggtaggttaagaatagttttgctgtactttlatagtgaaatagatttaggcagggataatcaccattatcgttccag accacctccaaccccgaggggaccggacagcccaaggaatagaaagaaaggtggagagagagacagag acagatccattcgattagtgaacggatctcagcggftaactttaaaagaaaaggggggattgggggtacagtgag gggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaacaaatcaaaaatcaaaaattt atcgagcttgcaaaagatggataaagtttaaacagagaggaatcttgcagctaatggaccttctggttgaaggag tgctCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCA CAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGGCAATTGAACCGGTGCCT AGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGC TCCGCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT</p>
--	---

	<p>CGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTA AGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCC CTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGAT CCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCCTT AAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTG GGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCT TTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCT TTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACT GGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCCTGCGTCCC AGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAA TCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCT CGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTC GGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGC AGGGAGCTCAAAAATGGAGGACGCGGGCCTCGGGAGAGCGGGCGGGTG AGTACCCACACAAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCTCAGCCGTCGCTTC ATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTC TCGAGCTTTTTGGAGTACGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATG CGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAG CTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGA TCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCC ATTTACAGGTGTCGTGAggaattcggtagccgcccggggatccatggccttaccagtgaccgccc ttgctcctgccgctggccttctgctccacgcccaggccgacatccagatgacacagactacatcctcctgctg cctctctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaatatftaaattggtatcagcagaaa ccagatggaactgftaaactcctgactaccatacatcaagattacactcaggagtcceatcaaggttcagtgagtg gtctggaacagattatctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttccaacagggtatac gcttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggagatcacagggtggcgggtggctcggcggtggtgggtgggt ggcggcgatctgaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcat gcactgtctcagggtctcattaccgactatgggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcat gggagtaataatgggtagtgaaccacataataatcagctcctcaaatccagactgacatcatcaaggacaactcc aagagccaagtttcttaaaaaatgaacagctgcaaacctgatgacacagccattactactgtgccaaacattactacg gtgtagctatgctatggactactggggccaaggaacctcagtcaccgtctcctcaaccagacgccagcggcggcga ccaccaacaccggcggcccaccatcgcgtcagcccctgtccctgcccagaggcgtgcccggcagcggcggg ggcgcgactgacacagggggctgacttgcctgtgatatctacatctggcgcccttggccgggactgtgggg tcctctcctgcaactggtatcaccttactgcaaacggggcagaagaactcctgtatataatcaacaaccattatg agaccagtcaaaactactcaagagggaagatggctgtagctgccgattccagaagaagaagaaggagatgtgaac gagagtgaagttcagcaggagcggcagacgccccgcgtacaagcaggggcagaaccagctataacagagctcaat ctaggacgaagagaggagtagctggtttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgaga aggagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaagataagatggcggaggcctacagtgagattggga tgaaaggcagcggcggaggggcaaggggcacgatggccttaccagggtctcagtagccaccaaggacacct acgacgcccctcactgagccctgccccctgtaagtcgacaatcaacctctgattacaaaattgtgaaagattg actggtattctaaactatggtccttttacgctatgtggatagctgcttfaatgcttctatcatgctattgctcccgtatg gcttctatttctcctctgtataaaactggtgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgcaggcaactgtggcgtg gtgtgcactgtttgctgacgcaacccccactggtggggcattgccaccacctgcactcctttccgggacttctgct tccccctcctattgccacggcggaaactcatgcccctgcccctgcccctgctggacagggcctgctgttgggc actgacaattcctggtgtgtcggggaagctgacgtccttccatggctgctgctgctgttggccacctggattctgccc gggagctcctctgctacgtccttggccctcaatccagcggacctccttcccggcctgctgcccgtctgccc ctcttccgctctcctcctcctcagcagctggtatccttggggcctccccgctggaaattcagactcgg taccttaagaccaatgactacaaggcagctgtagcttagccacttttaaaagaaaaggggggactggaagggcta attcactccaacgaagacaagatctgcttttctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctct ctggtaactaggaaccactgcttaagcctcaataagcttgccttgaagtctcaagtgtgtgcccctctgtt</p>
--	--

gtgactctggtaactagagatccctcagaccctfftagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagtcatgcatcttatt
 attcagatttataacttgcaaaagaatgaatatcagagagtgagaggaaactgtttattgcagcttataatggttcaaaata
 aagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcatttttctactgcattctagttgtggtttgccaactcatcaatgtatct
 tatcatgctggcctagctatcccgccctaaactccgccagttccgccattctccgcccatggtgactaattttttta
 tttatgcagaggccgaggccgctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctaggcttt
 tgcgtcgagacgtaccaattcgccctatagtgagtcgtattacgcgcgctcactggcctgcttttacaacgctgctgact
 gggaaaaccctggcgttacccaactaatgccttgagcacatcccccttccagctggcgtaatagcgaagagg
 cccgcaccgatcgccctcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcgacgcgcctgtagcggcgcaata
 agcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacactgccagcgcctagcgcgcctgtagcggcgcaata
 tcccttcttctcgcacgttcgcccgttcccgtaagctctaaatcgggggctcctttagggttccgatttagtgc
 ttacggcacctcgaccccaaaaaactgattagggtagtggtcacgtagtgggcatcgccctgatagacggttttctg
 cctttgacgtggagtcacgttcttaatagtgactcttcttccaaactggaacaacactcaacctatctcggctatt
 cttttgattataagggttttgcgatttcggcctattggttaaaaaatgagcctgatttaacaaaaattaacgcgaatttaa
 caaaatattaacggttacaatttcc

Para la tabla 12: **EN NEGRITA, SUBRAYADO, MAYÚSCULAS** = sitio mutante ámbar

Tabla 15. Secuencia de aminoácidos de dominios de interacción con la diana (anticuerpos) de interruptores de CAR-EC

NOMBRE	SEQ ID	SECUENCIA
Cadena ligera de anticuerpo anti-CS1 de tipo natural	10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGIAVAWYQQKPGK VPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATY YCQQYSSYPYTFGQGKLEIK
Cadena pesada de anticuerpo anti-CS1 de tipo natural	11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDPSRYWMSWVRQAP GKGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDKFIISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARPDGNYWYFDVWGQGTLVTVSS
Cadena ligera de anticuerpo anti-EGFRvIII (Hu806 VL)	12	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSF KGLIYHGNTLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYC VQYAQFPWTFGGGKLEIK
Cadena pesada de anticuerpo anti-EGFRvIII (Hu806 HL)	13	QLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKG LEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFFLKLNSVTAA DTATYYCVTAGRFPYWGQGTLVTVSS
Cadena ligera de anticuerpo anti-BCMA (BCMA98)	14	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRANQGINSNNLNWYQQKPGKA PKPLIYYTNSNLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYC QQFTSLPYTFGQGKLEIK
Cadena pesada de anticuerpo anti-BCMA (BCMA98)	15	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPG KGLVWVSSITGGGDTYYADSVKGRFTISRDNKSTLYLQMD SLRSEDVAVYYCVRHGYDGYHLFDYWGQGTLVTVSS
Cadena ligera de Fab anti-CD19	16	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGNTLPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGEC
Cadena pesada de Fab anti-CD19	17	EVKLVESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQ TDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHT

Tabla 16. Secuencia de aminoácidos de TID de interruptores de molécula pequeña de CAR-EC		
NAME	SEQ ID	SECUENCIA
SS-14 (análogo de somatostatina)	18	Ala-Gly-ciclo(Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys)
OC (análogo de somatostatina)	19	D-Phe1-ciclo(Cys2-Phe3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
TOC (análogo de somatostatina)	20	D-Phe1-ciclo(Cys2-Tyr3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
TATE (análogo de somatostatina)	21	D-Phe1-ciclo(Cys2-Tyr3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr8
NOC (análogo de somatostatina)	22	D-Phe1-ciclo(Cys2-1-Nal3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
NOC-ATE (análogo de somatostatina)	23	D-Phe1-ciclo(Cys2-1-Nal3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr8
BOC (análogo de somatostatina)	24	D-Phe1-ciclo(Cys2-BzThi3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
BOC-ATE (análogo de somatostatina)	25	D-Phe1-ciclo(Cys2-BzThi3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr8
KE108 (análogo de somatostatina)	26	Tyr-ciclo(DAB-Arg-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe)
LM3 (análogo de somatostatina)	27	p-CI-Phe-ciclo(D-Cys-Tyr-D-Aph(Cbm)-LysThr-Cys)D-Tyr-NH2
BN (análogo de bombesina)	28	pGlu1-Gln2-Arg3-Leu4-Gly5-Asn6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Met14-NH2
RP527 (análogo de bombesina)	29	N3S-Gly-5-Ava-[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Met14-NH2]
Demobesin 1 (análogo de bombesina)	30	N40-1-bzlg0 [D-Phe6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu-NHET13]
Demobesin 4 (análogo de bombesina)	31	N4-[Pro1-Gln2-Arg3-Tyr4-Gly5-Asn6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Nle14-NH2]
BBS-38 (análogo de bombesina)	32	(NαHis)Ac-β-Ala-β-Ala-[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Cha13-Nle14-NH2]
BAY 86-4367 (análogo de bombesina)	33	3-ciano-4-trimetilammonio-benzoil-Ala(SO3H)-Ala(SO3H)-Ava-[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-NMeGly11-His12-Sta13-Leu14-NH2]
MG (análogo de minigastrina)	34	Leu1-Glu2-Glu3-Glu4-Glu5-Glu6-Ala7-Tyr8-Gly9-Trp10-Met11-Asp12-Phe13-NH2
MG0 (análogo de minigastrina)	35	D-Glu1-Glu2-Glu3-Glu4-Glu5-Glu6-Ala7-Tyr8-Gly9-Trp10-Met11-Asp12-Phe13-NH2
MG11 (análogo de minigastrina)	36	D-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH2
H2-Met (análogo de minigastrina)	37	His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH2
H2-Nle (análogo de minigastrina)	38	His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH2
Demogastrin (análogo de minigastrina)	39	N4-D-Glu-(Glu)5-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH2
Ciclo-MG1 (análogo de minigastrina)	40	c(γ-D-Glu-Ala-Tyr-D-Lys)-Trp-Met-Asp-Phe-NH2
MGD5 (análogo de minigastrina)	41	Gly-Ser-Cys(succinimidopropionil-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH2)-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH2
Buserelina (análogo de GnRHg)	42	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Ser(tBu) 6-Leu7-Arg8-Pro9-NHC2H5
Goserelina (análogo de GnRH)	43	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Ser(tBu) 6-Leu7-Arg8-Pro9-AzGly10-NH2
Leuprolida (análogo de GnRH)	44	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Leu6-Leu7-Arg8-Pro9-NHC2H5
Nafarelina (análogo de GnRH)	45	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Nal (2) 6-Leu7-Arg8-Pro9-NHC2H5
Triptorelina (análogo de GnRH)	46	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Trp6-Leu7-Arg8-Pro9-Gly10-NH2
Abarelix (análogo de GnRH)	47	Ac-D-Ala1-D-Cpa2-D-Ala3-Ser4-Tyr5-D-Asp6-Leu7-Ilys8-Pro9-DAla10-NH2
Acilina (análogo de GnRH)	48	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Aph(Ac)5-D-Aph(Ac)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
Antarelix (análogo de GnRH)	49	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Tyr5-D-Hci6-Leu7-Ilys8-Pro9-DAla10-NH2
Antida (análogo de GnRH)	50	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Lys(Nic)5-D-Lys(Nic)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
Azalina B (análogo de GnRH)	51	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Aph (Atz) 5-D-Aph(Atz)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
Cetrorelix (análogo de GnRH)	52	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Tyr5-D-Cit6-Leu7-Arg8-Pro9-DAla10-NH2
Degarelix (análogo de GnRH)	53	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Aph(L-hidroorotil)5-D-Aph(carbamoil)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
Ganirelix (análogo de GnRH)	54	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pa13-Ser4-Tyr5-D-hArg (Et2)6-Leu7-hArg(Et2)8-Pro9-D-Ala10-NH2
Ozarelix (análogo de GnRH)	55	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-N-MeTyr5-D-hCit6-Nle7-Arg8-

ES 2 741 308 T3

		Pro9-D-Ala10-NH2
LHRH	56	Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH2

Tabla 17. Secuencia de aminoácidos de ligador de interruptor de CAR-EC		
NOMBRE	SEQ ID	SECUENCIA
Ligador	57	(GGGS) _n , en la que n≥1
Ligador de 25 aminoácidos	58	SSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDG

REIVINDICACIONES

1. Interruptor para activar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC), comprendiendo el interruptor:
- 5
- a. un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y
- b. un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural, en el que el TID interacciona con una molécula de superficie en una célula diana, y en el que el CAR-ID se une al TID por medio del aminoácido no natural.
- 10
2. Interruptor según la reivindicación 1,
- 15
- a. que comprende además un ligador,
- (i) en el que el ligador une el CAR-ID al TID por medio del aminoácido no natural,
- (ii) en el que el ligador une de manera específica de sitio el CAR-ID al aminoácido no natural del TID, o
- 20
- (iii) en el que el ligador comprende preferiblemente un grupo aminoóxido, grupo azida, grupo ciclooctino, o una combinación de los mismos en uno o más extremos terminales; o
- b. en el que el CAR-ID comprende una molécula pequeña, en el que la molécula pequeña es
- 25
- (i) un hapteno,
- (ii) isotiocianato de fluoresceína (FITC), en el que el TID se conjuga con un isotiocianato de FITC o comprende además un ligador que se conjuga con un isotiocianato de FITC, o
- 30
- (iii) biotina.
3. Interruptor según la reivindicación 1,
- 35
- a. en el que el TID se basa en o se deriva de al menos una porción de un anticuerpo; o
- b. en el que el TID se basa en o se deriva de al menos una porción de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv); o
- 40
- c. en el que el TID se basa en o se deriva de al menos una porción de un anticuerpo anti-CD 19; o
- d. en el que el TID se basa en o se deriva de al menos una porción de un dominio variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-CD 19; o
- 45
- e. en el que el TID se basa en o se deriva de al menos una porción de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-BMSA, anti-CEA, anti-CLL1, anti-CS1, anti-EGFR y anti-Her2; o
- 50
- f. en el que el TID se basa en o se deriva de al menos una porción de un dominio variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-BMSA, anti-CEA, anti- CLL1, anti-CS1, anti-EGFR y anti-Her2 y en el que el aminoácido no natural se inserta en la porción del anticuerpo a partir de la cual se basa o se deriva el TID, o reemplaza a un aminoácido del anticuerpo a partir del cual se basa o se deriva el TID.
- 55
4. Composición que comprende una pluralidad de interruptores para activar una célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC), en la que un interruptor de la pluralidad de interruptores comprende (a) un dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y (b) un dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural, en la que el TID interacciona con una molécula de superficie en una célula diana, en la que el CAR-ID se une al TID por medio del aminoácido no natural y en la que al menos aproximadamente el 60% de los interruptores son estructuralmente homólogos.
- 60
5. Composición según la reivindicación 4,
- 65
- a. en la que el CAR-ID comprende una molécula pequeña; o

- b. en la que el CAR-ID comprende isotiocianato de fluoresceína (FITC); o
- c. en la que el TID comprende una molécula pequeña seleccionada del grupo que consiste en ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico, folato, o un derivado del mismo; o
- 5 d. en la que el interruptor de la pluralidad de interruptores comprende además un ligador, en la que el ligador une el CAR-ID al TID.
6. Composición según la reivindicación 4,
- 10 a. en la que el CAR-ID se une al mismo sitio predeterminado en el TID en al menos aproximadamente el 80% de los interruptores.
7. Primer interruptor de célula efectora con receptor de antígeno quimérico (CAR-EC) para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad, comprendiendo el interruptor:
- 15 i. un primer dominio de interacción con receptor de antígeno quimérico (CAR-ID) que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en la CAR-EC; y
- 20 ii. un primer dominio de interacción con la diana (TID) que comprende un aminoácido no natural, en el que el TID interacciona con una primera molécula de superficie en una célula diana y en el que el TID comprende un CAR-ID unido de manera específica de sitio al TID por medio del aminoácido no natural,
- 25 en el que el método comprende administrar el primer interruptor de CAR-EC y administrar además una primera célula efectora con receptor de antígeno quimérico que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une al primer CAR-ID del primer interruptor de CAR-EC a un sujeto.
8. Interruptor para su uso según la reivindicación 7, en el que un ligador une de manera específica de sitio el primer CAR-ID al aminoácido no natural del primer TID.
- 30 9. Interruptor para su uso según la reivindicación 7, en el que el primer CAR-ID comprende una molécula pequeña.
10. Interruptor para su uso según la reivindicación 9, en el que la molécula pequeña se selecciona de (i) un hapteno y (ii) un hapteno seleccionado de isotiocianato de fluoresceína (FITC) o biotina.
- 35 11. Interruptor para su uso según la reivindicación 7, en el que el primer TID comprende al menos un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo o al menos un fragmento de unión a antígeno de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv).
- 40 12. Interruptor para su uso según la reivindicación 7, en el que el primer TID comprende al menos un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-CD19 o al menos un fragmento de unión a antígeno de un dominio variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-CD 19.
- 45 13. Interruptor para su uso según la reivindicación 7, en el que el primer TID comprende al menos un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-BMSA, anti-CEA, anti-CLL1, anti-CS1, anti-EGFR y anti-Her2 o al menos un fragmento de unión a antígeno de un dominio variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-BMSA, anti-CEA, anti-CLL1, anti-CS1, anti-EGFR y anti-Her2.
- 50 14. Interruptor para su uso según la reivindicación 7, que comprende además administrar uno o más segundos interruptores de CAR-EC al sujeto, comprendiendo cada segundo interruptor de CAR-EC:
- 55 i. un segundo CAR-ID que interacciona con un receptor de antígeno quimérico en una célula efectora; y
- ii. un segundo TID que comprende un aminoácido no natural, en el que el segundo TID comprende el segundo CAR-ID unido de manera específica de sitio por medio del aminoácido no natural; y
- 60 en el que el segundo TID interacciona con una molécula de superficie en una célula diana;
- en el que el segundo CAR-ID comprendido en cada segundo interruptor de CAR-EC es opcionalmente
- (i) el mismo que el primer CAR-ID comprendido en el primer interruptor de CAR-EC o
- 65 (ii) un segundo CAR-ID que difiere del primer CAR-ID comprendido en el primer interruptor de CAR-EC;

siempre que si el segundo CAR-ID que difiere del primer CAR-ID, el método comprende además administrar un segundo CAR-EC que comprende un receptor de antígeno quimérico que interacciona con el segundo CAR-ID del segundo interruptor de CAR-EC.

- 5
15. Interruptor para su uso según la reivindicación 14, en el que
- 10
- (i) el primer TID comprende un anticuerpo anti-CD20 o una porción de unión a antígeno del mismo y el segundo TID comprende un anticuerpo anti-CD 19 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; o
- (ii) el primer TID comprende un anticuerpo anti-CD 19 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el segundo TID comprende un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 15
16. Interruptor para su uso según una cualquiera de la reivindicación 7-15, en el que la enfermedad es un cáncer.

FIG. 1

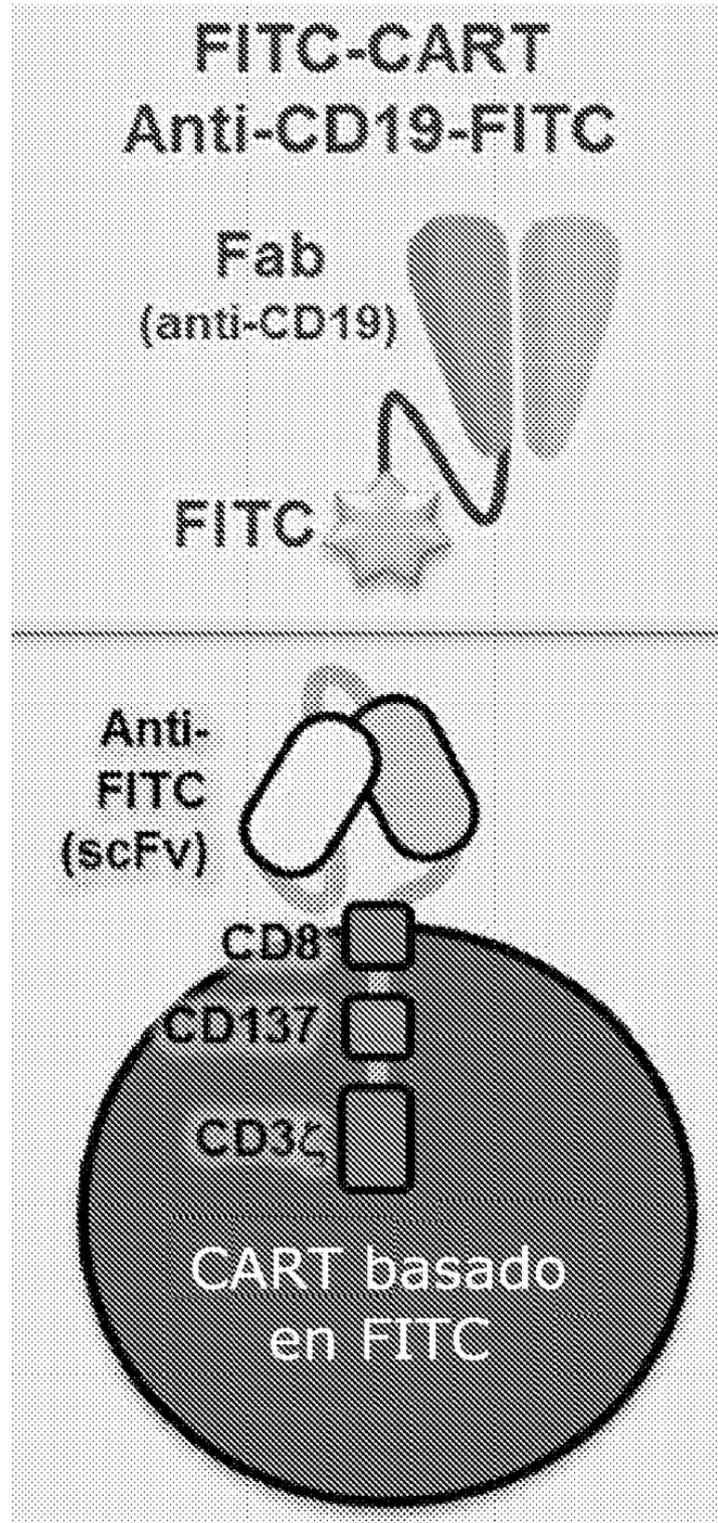


FIG. 2A

Fab anti-CD19

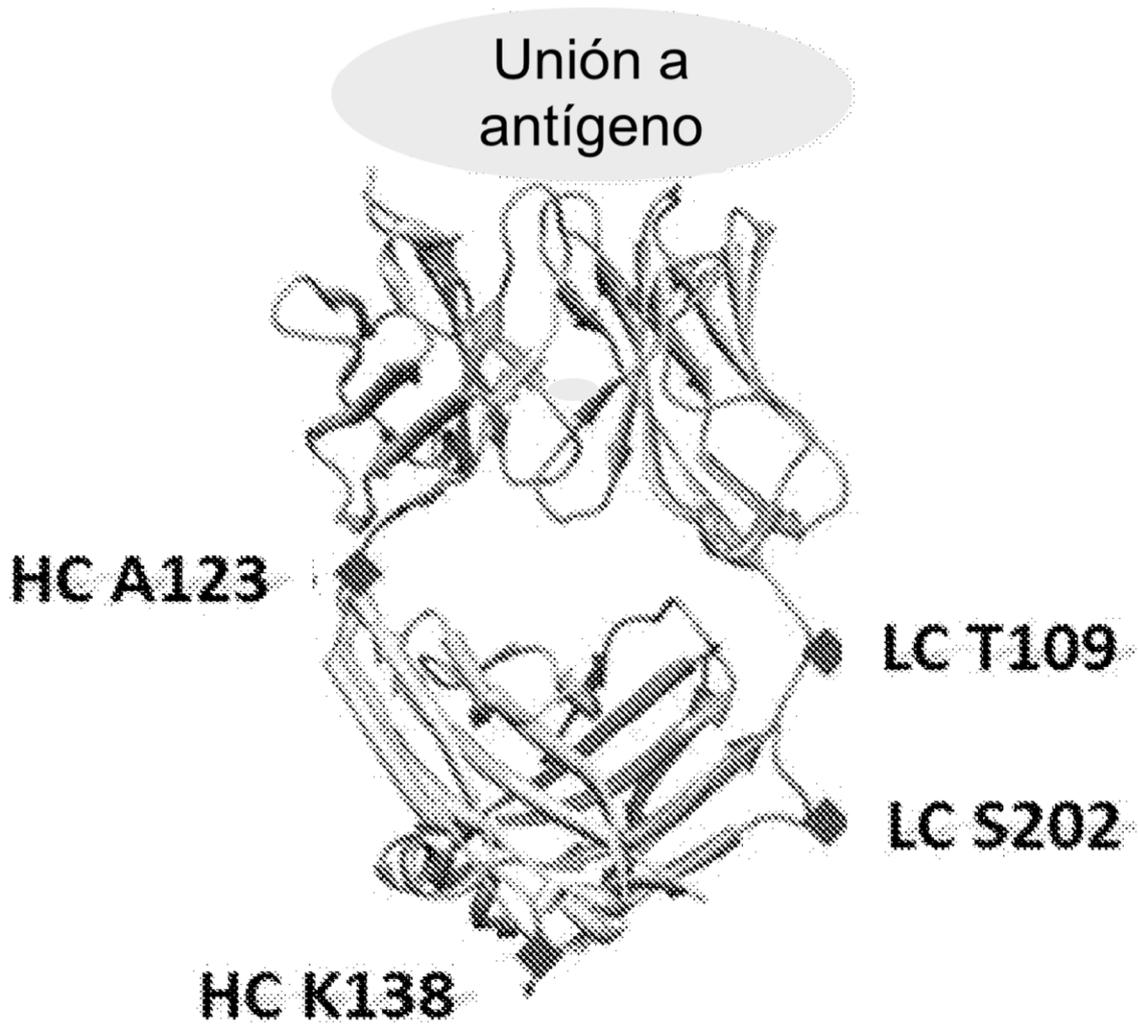


FIG. 2B

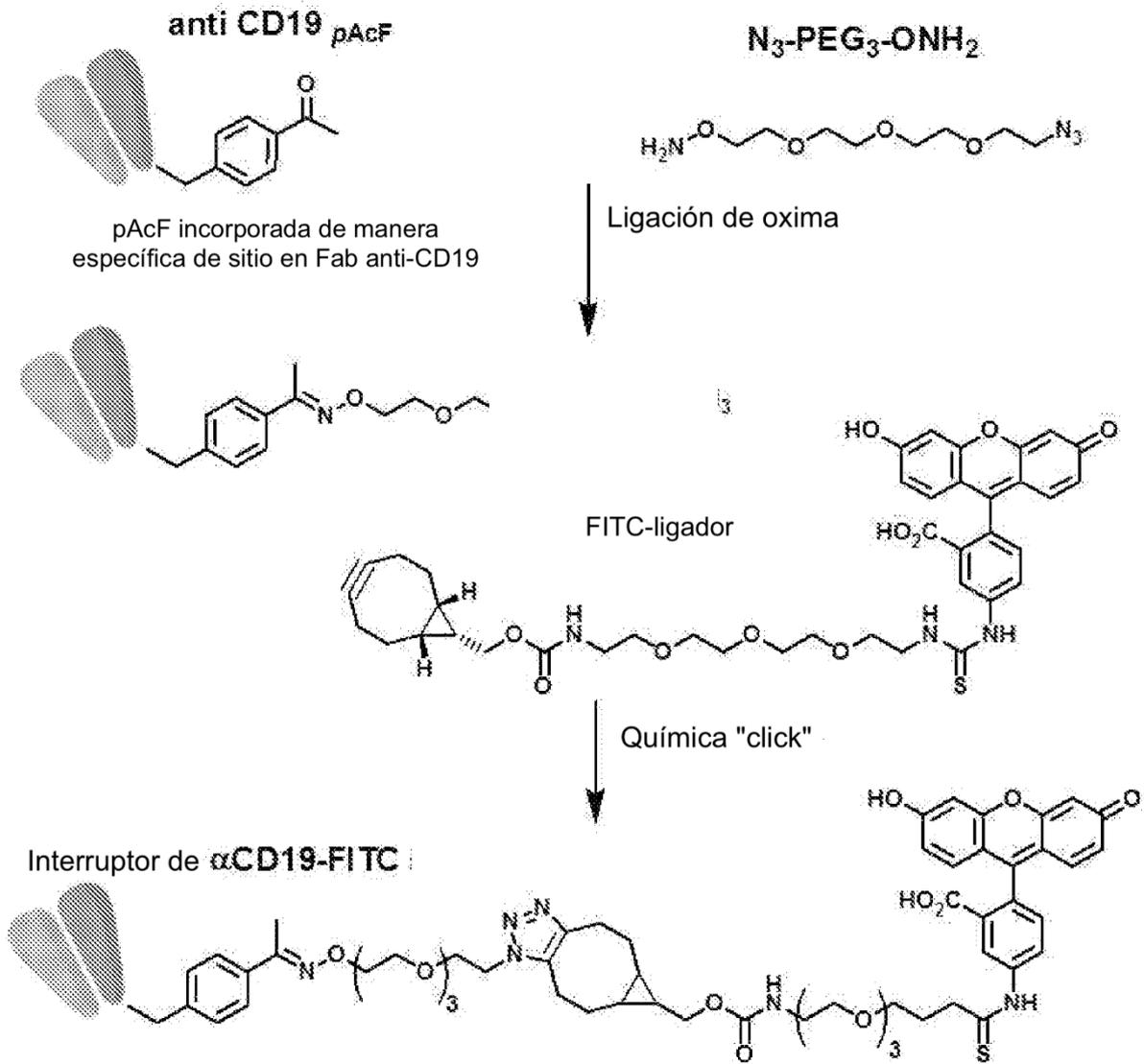


FIG. 3A-B

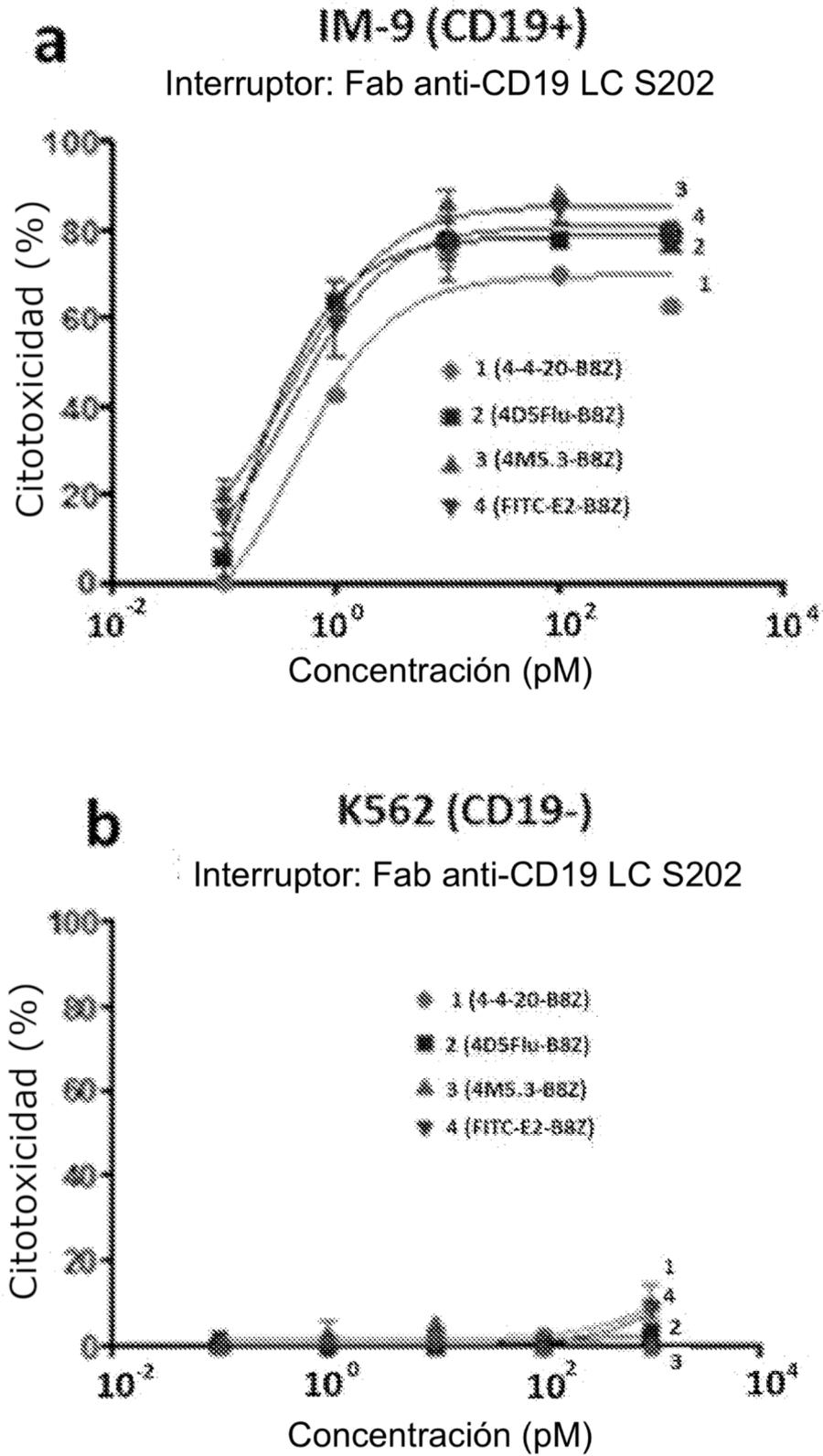


FIG. 3C-D

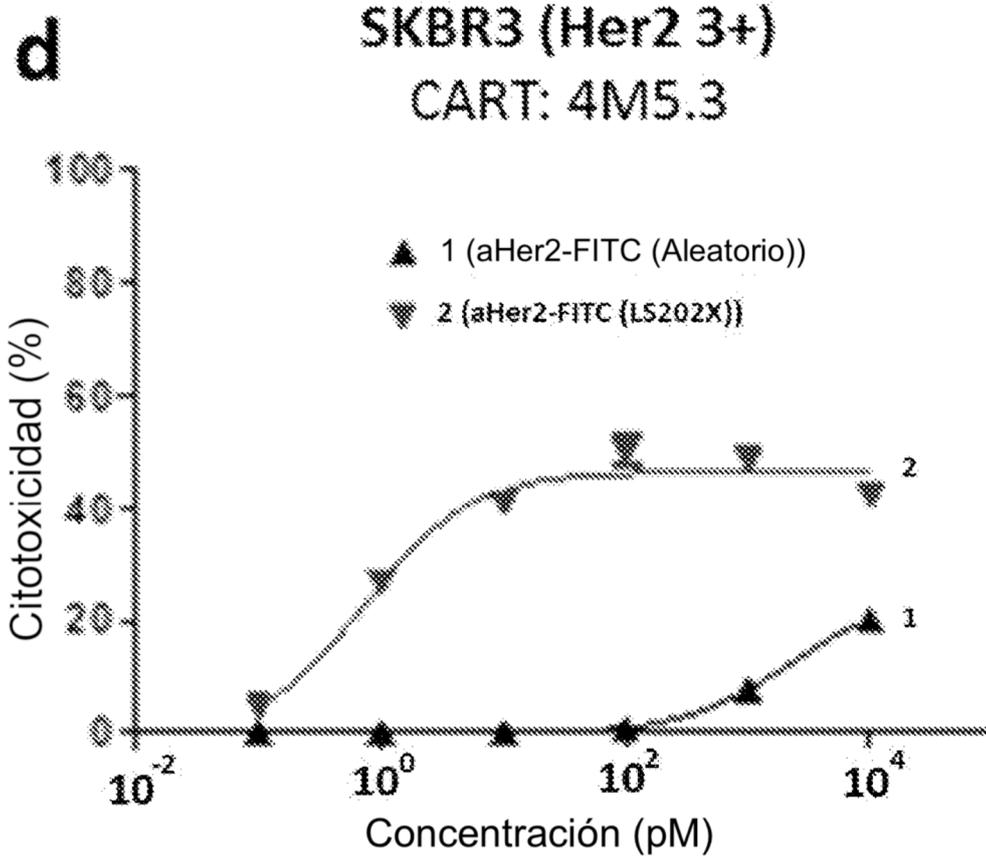
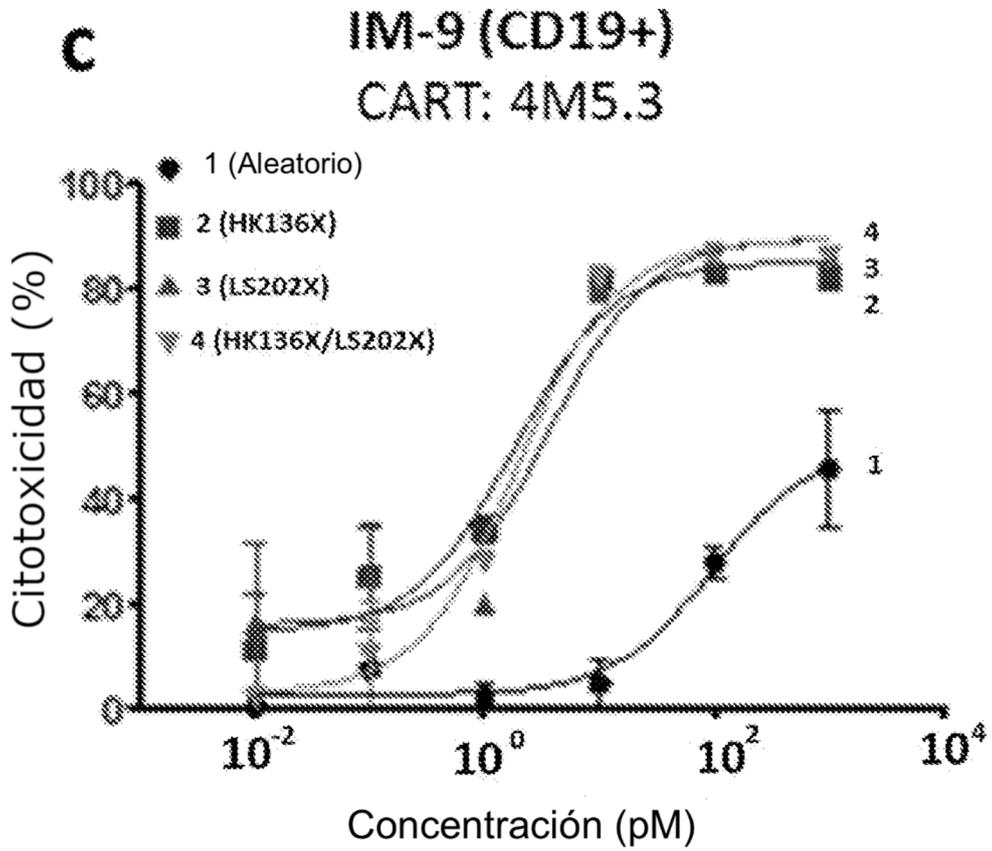


FIG. 4A

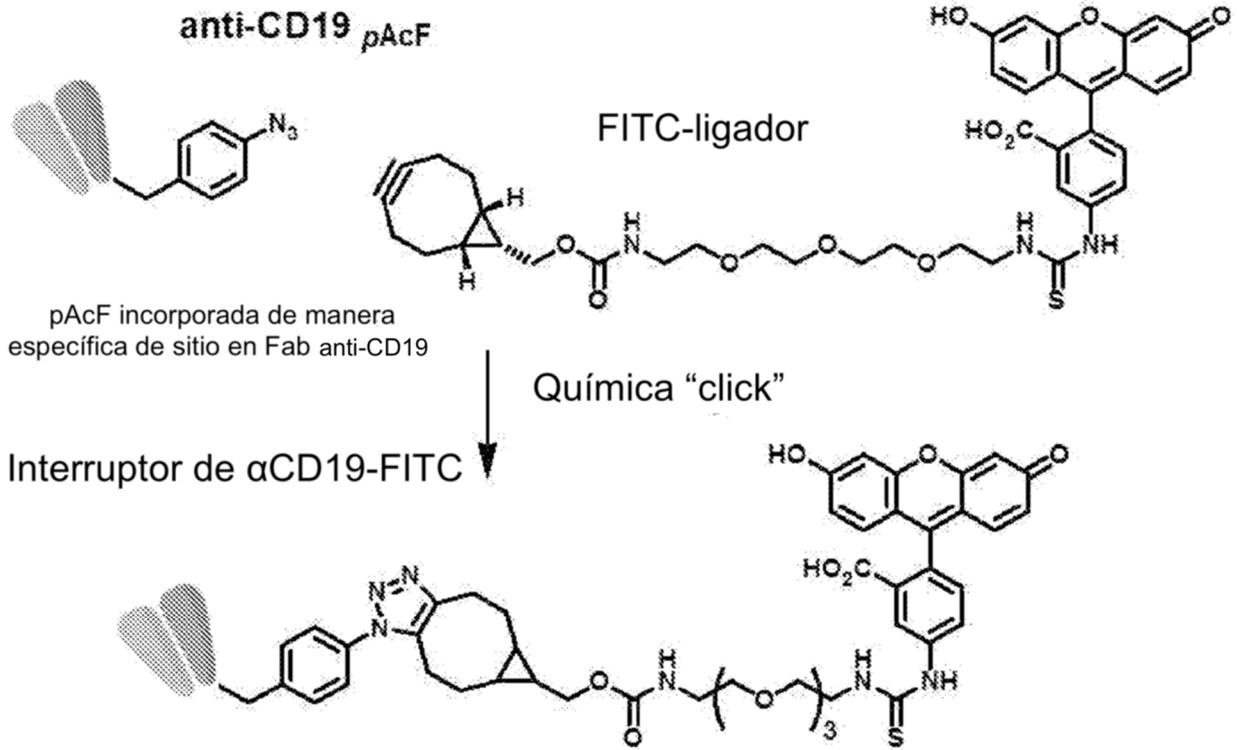


FIG. 4B

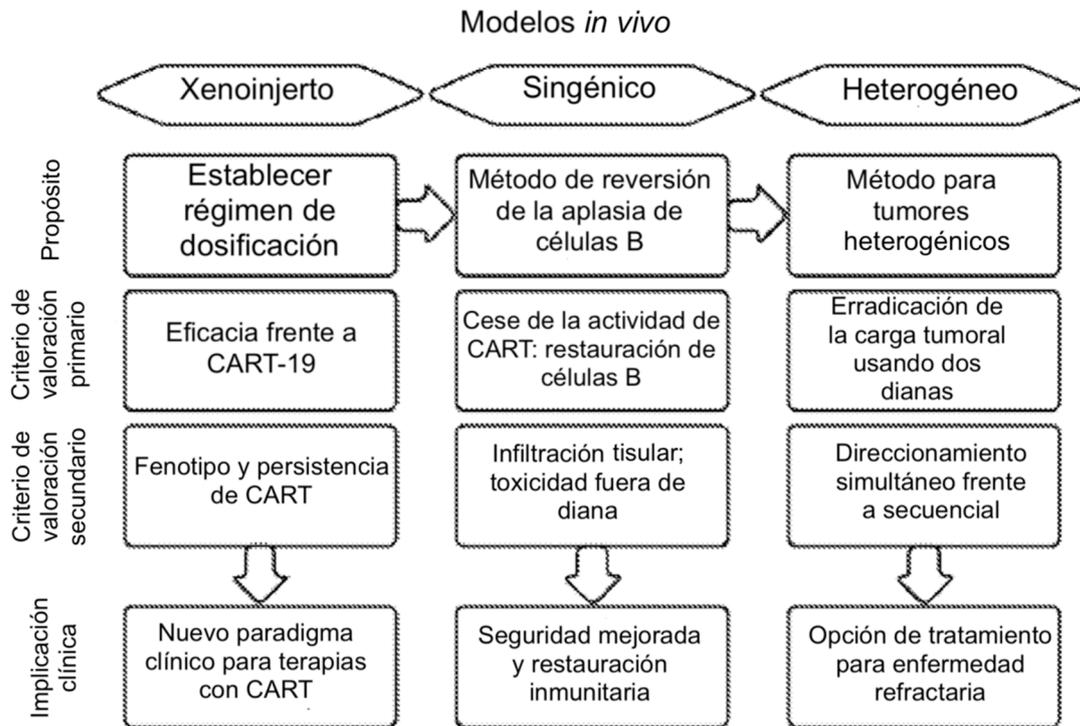


FIG. 5A

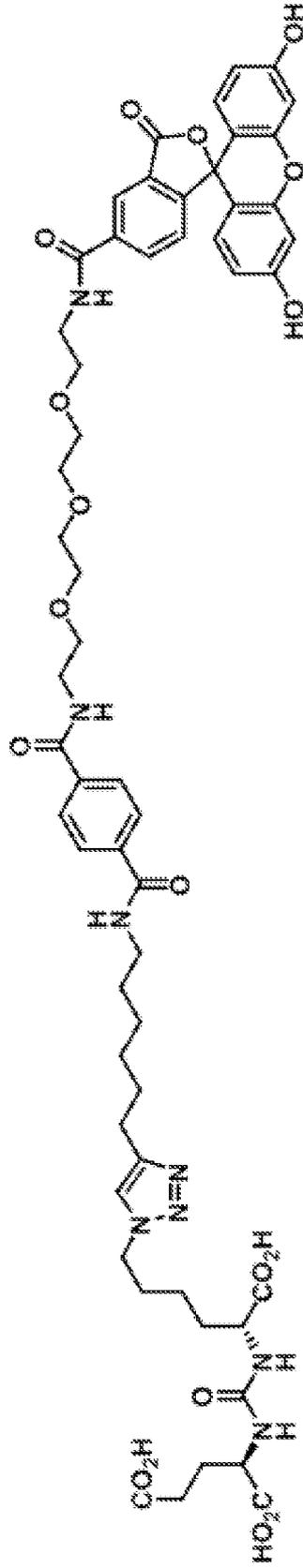


FIG. 5B

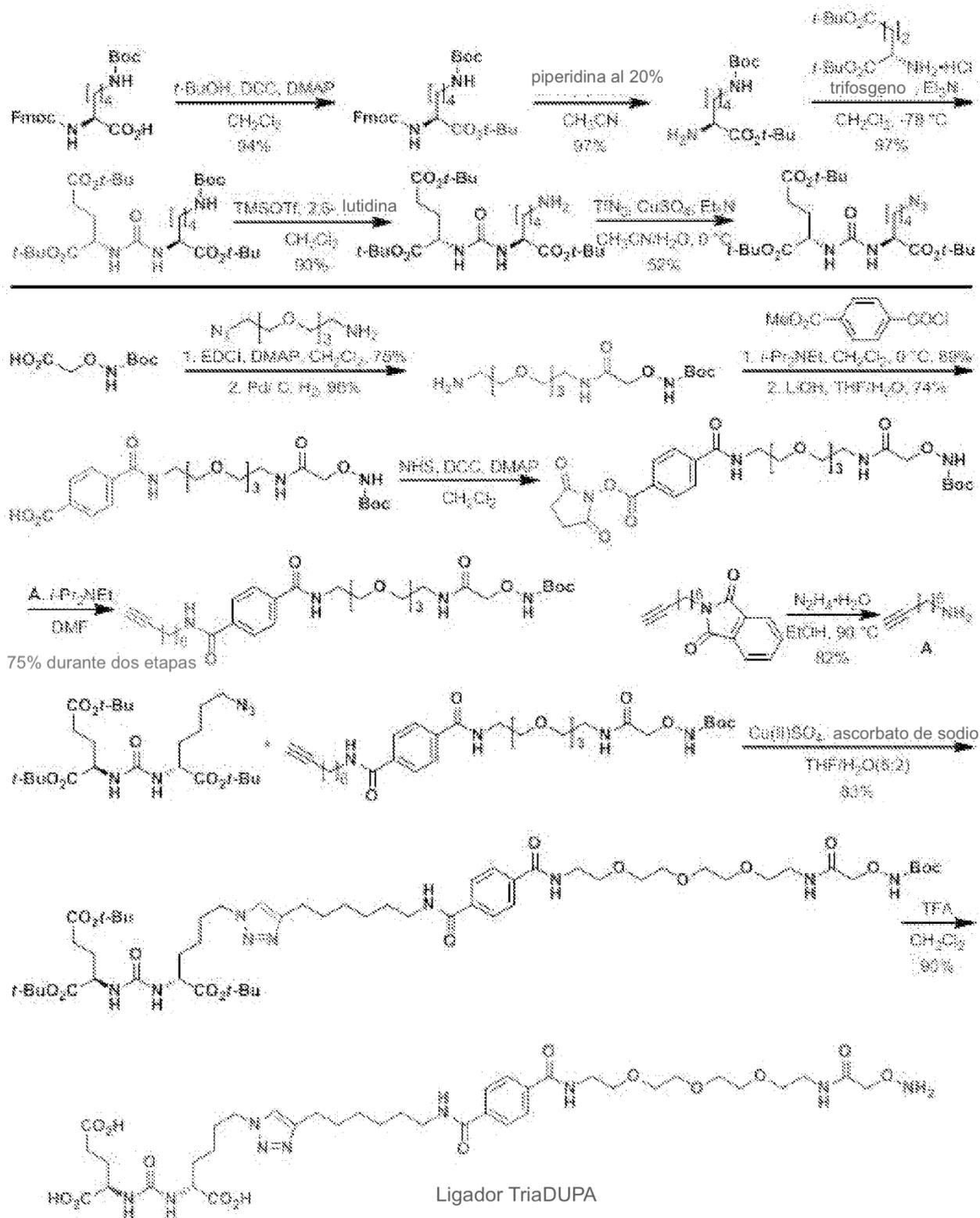


FIG. 5C

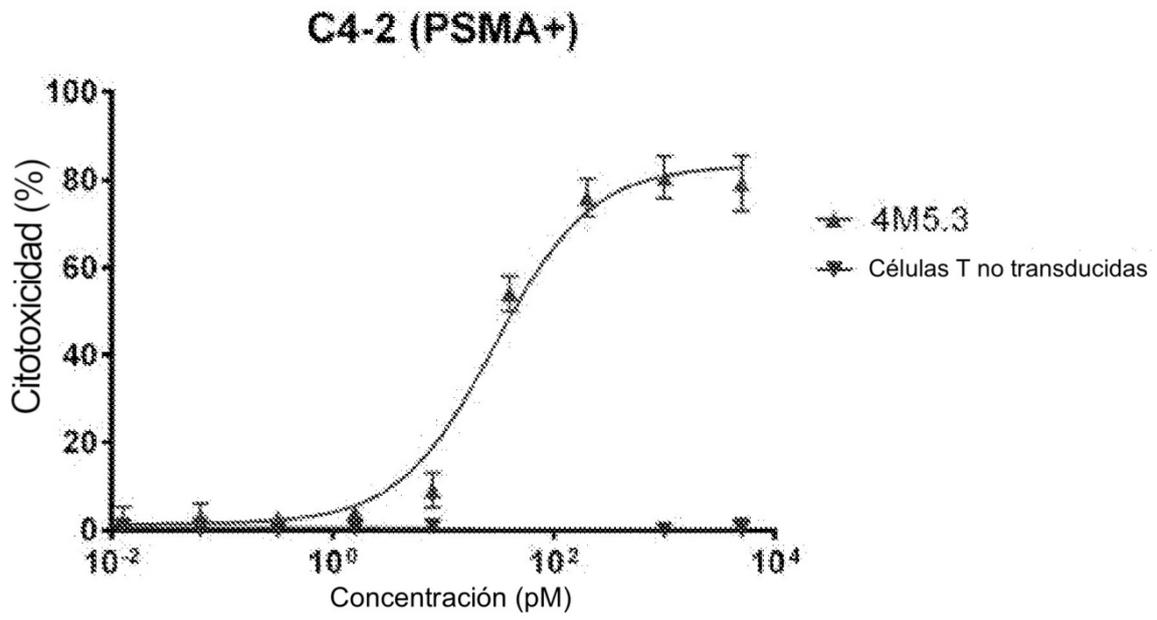


FIG. 6A

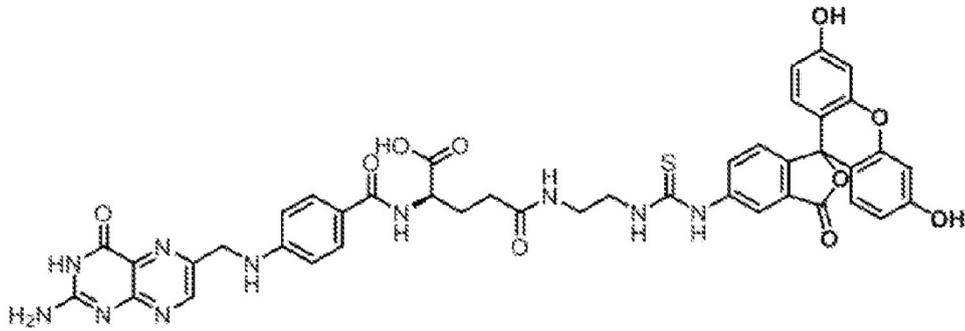


FIG. 6B

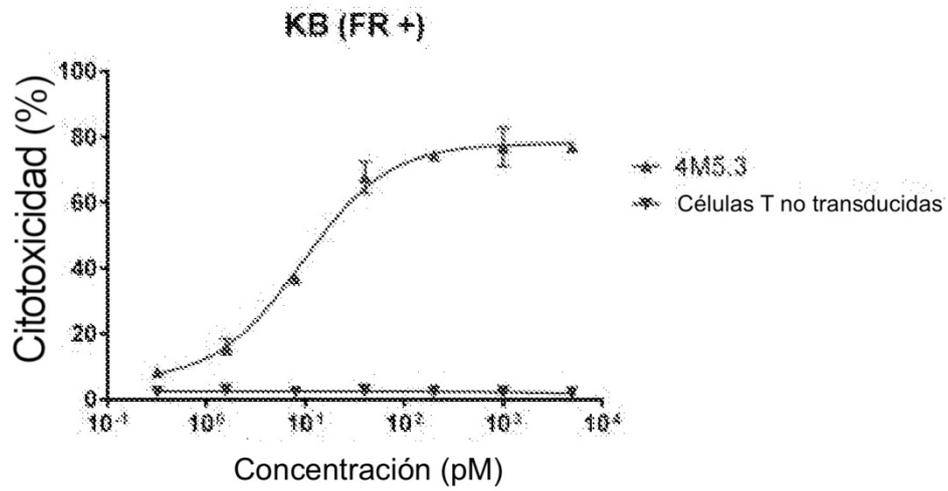


FIG. 6C

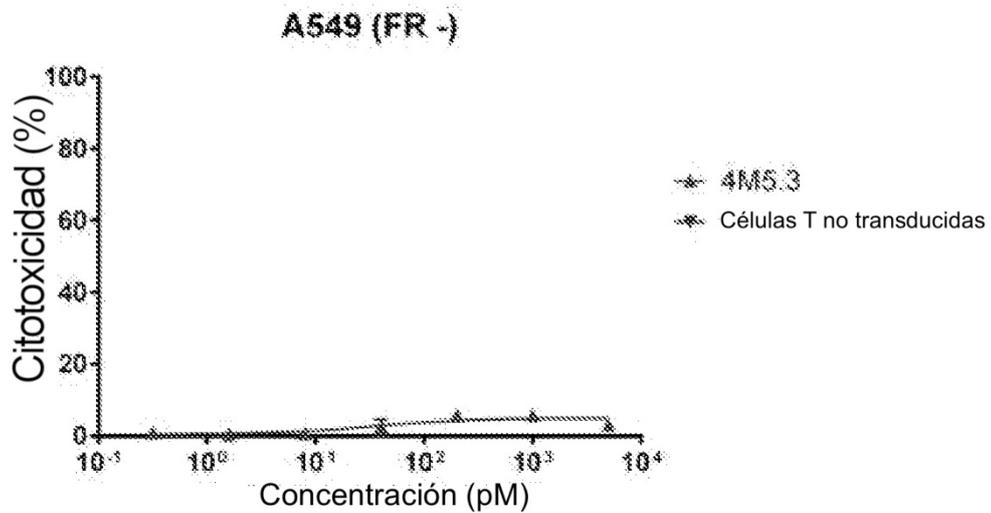
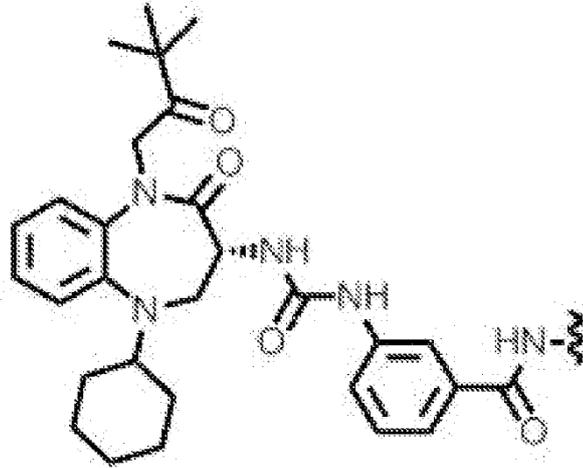


FIG. 7



Antagonista de CCK2

FIG. 8

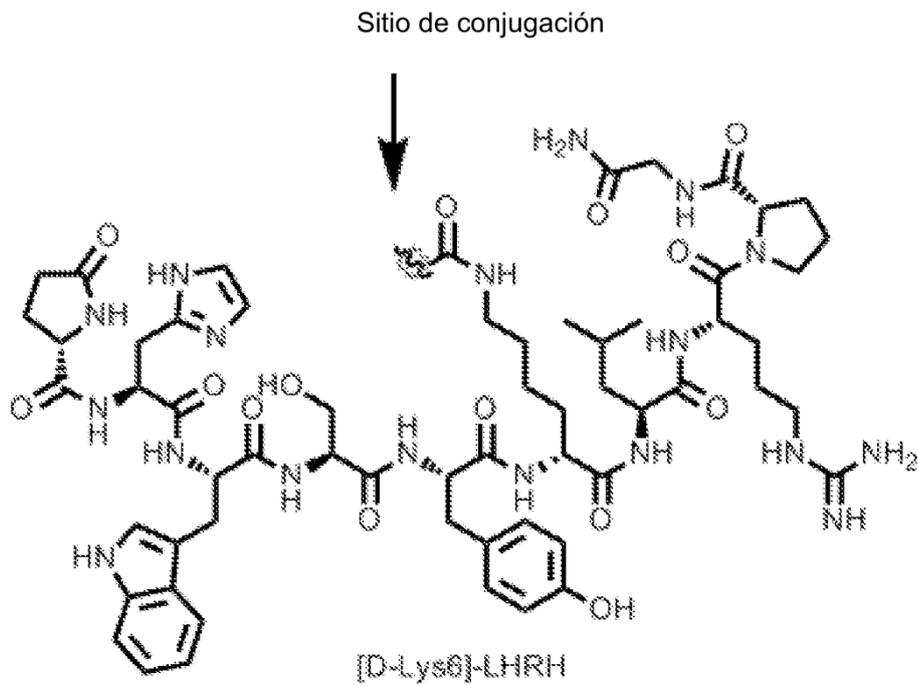


FIG. 9A

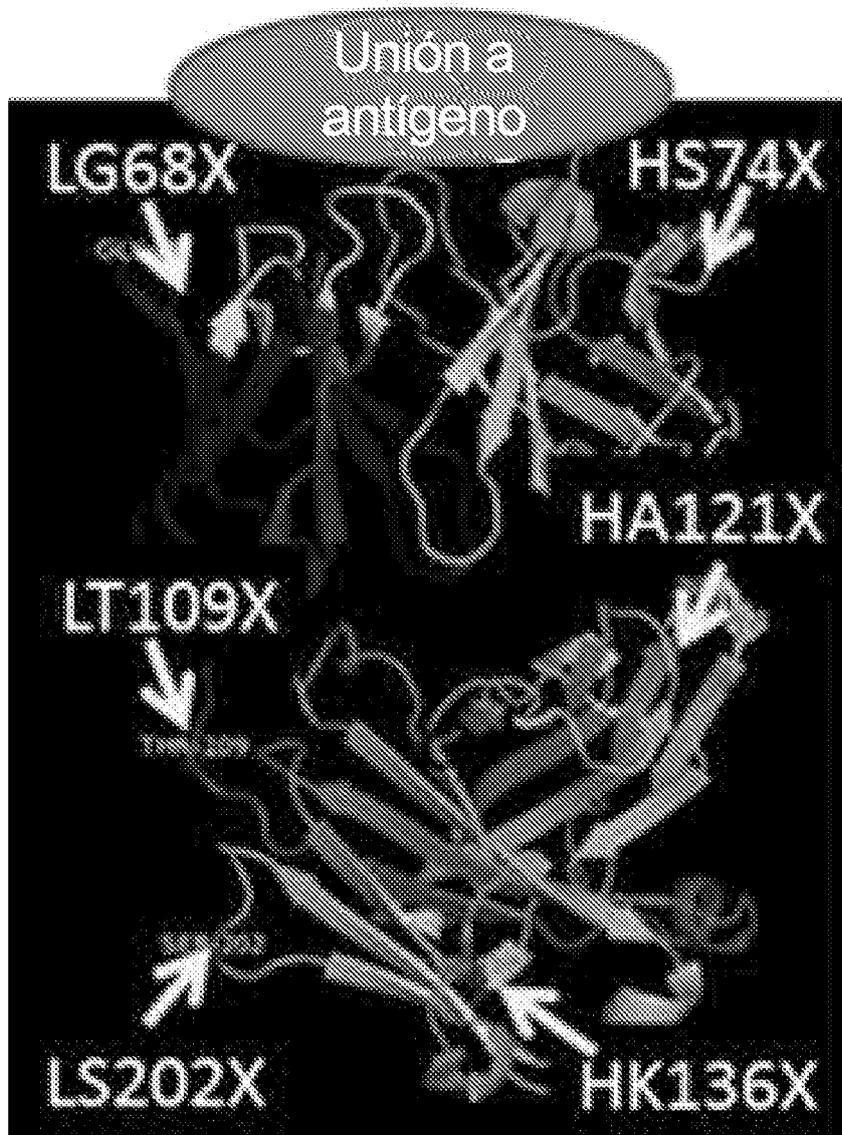


FIG. 9B

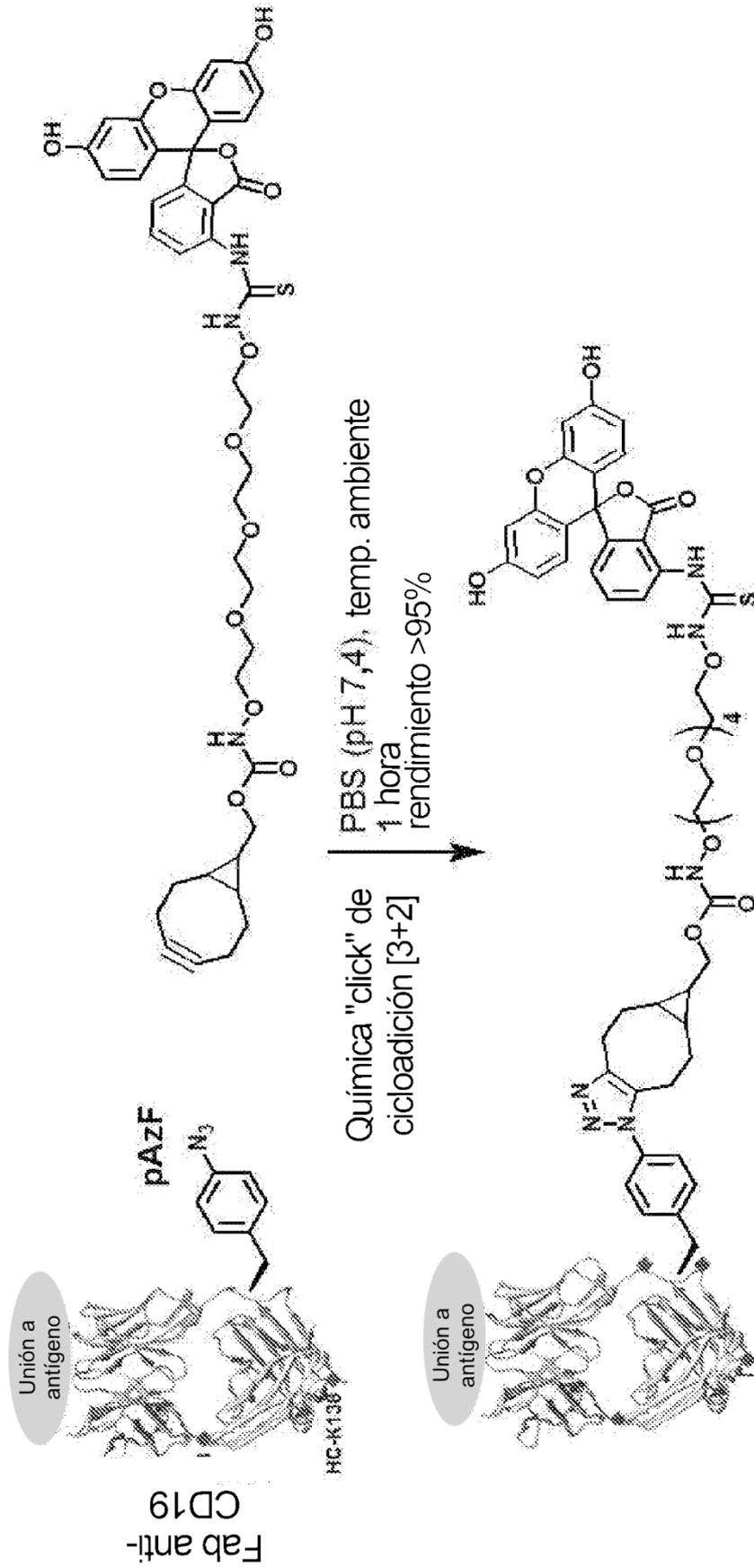


FIG. 10A-G

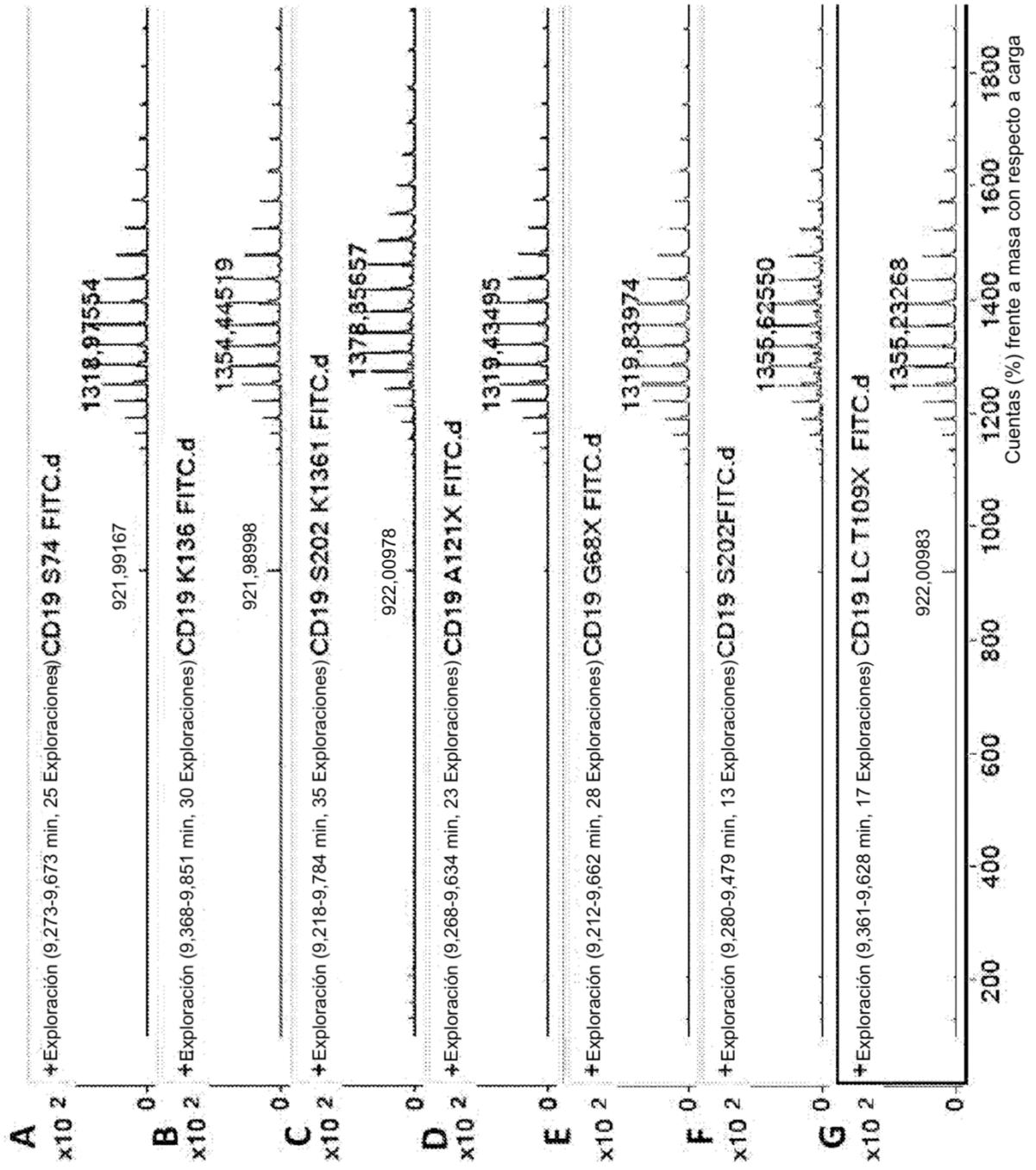


FIG. 10H-N

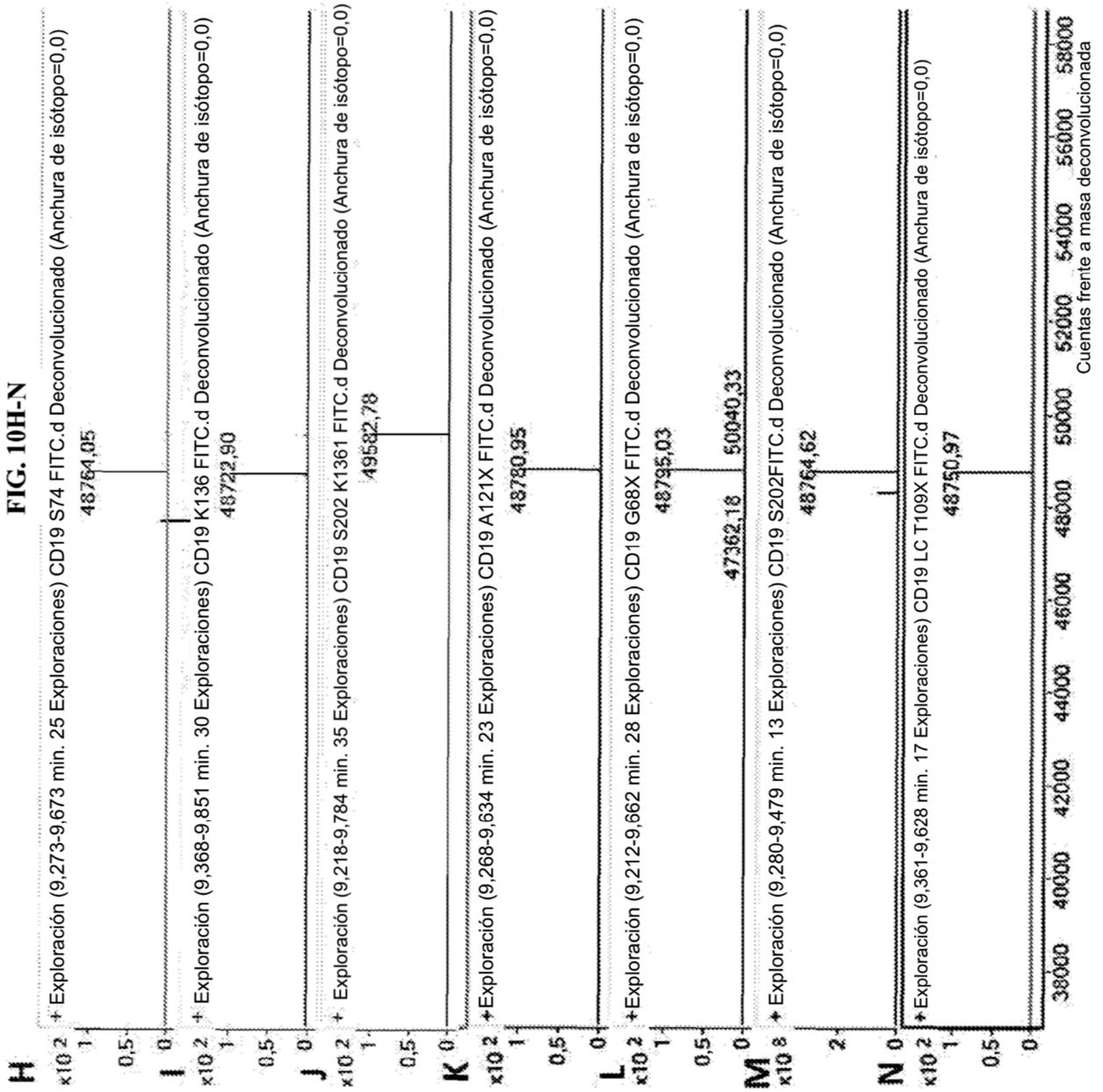


FIG. 11

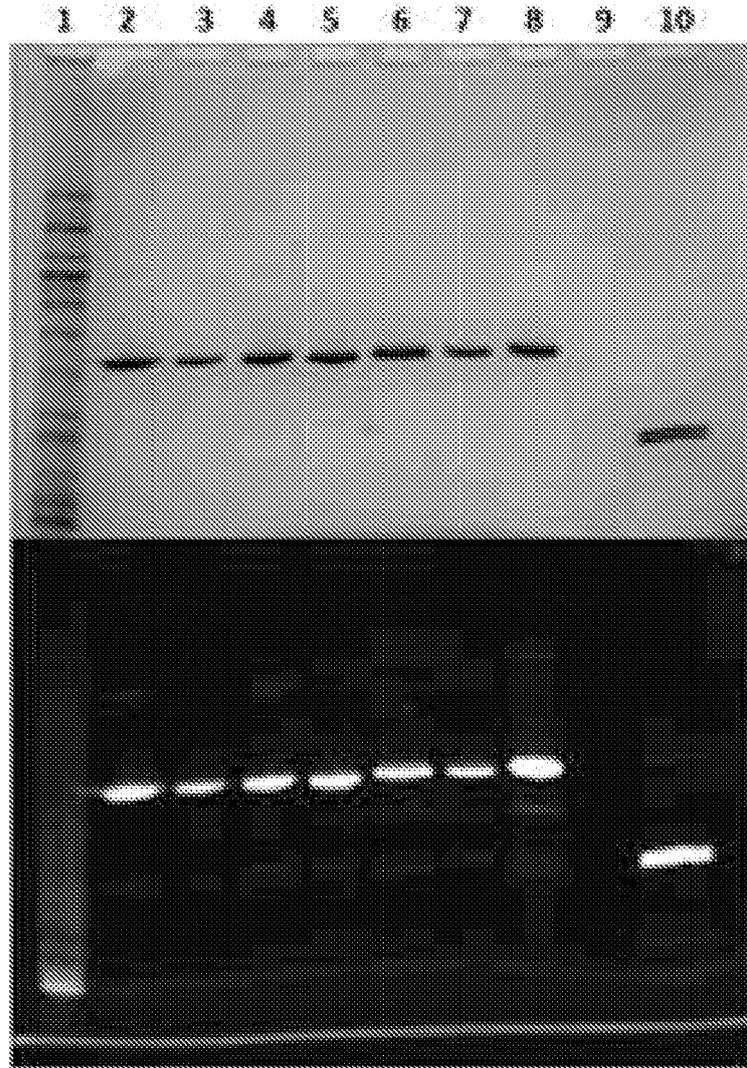


FIG. 12

Nalm-6 (ET 5 con respecto a 1 - 24h)

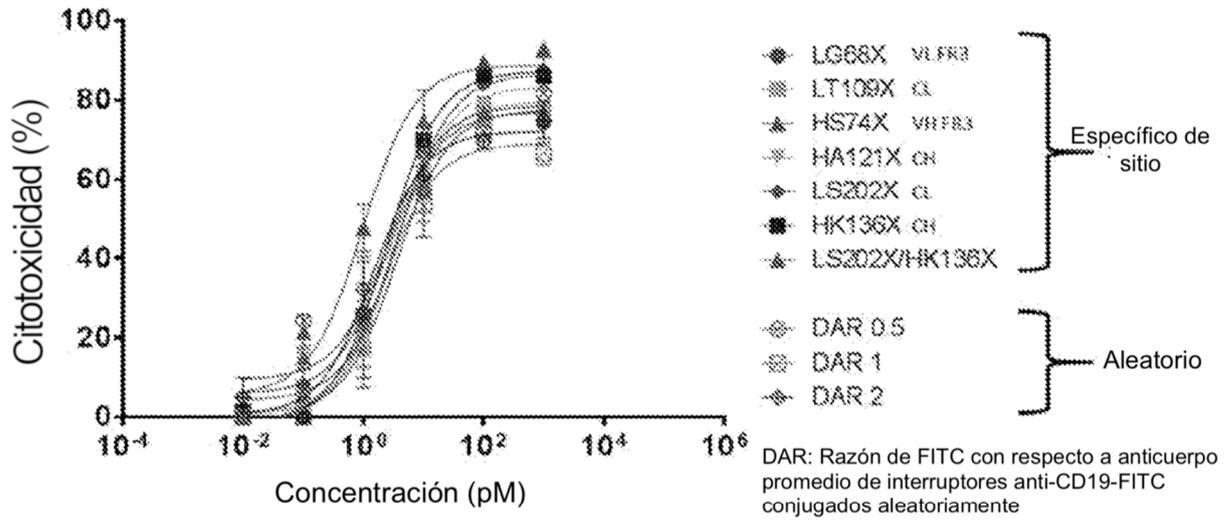


FIG. 13

Modelo de xenoinjerto de C4-2

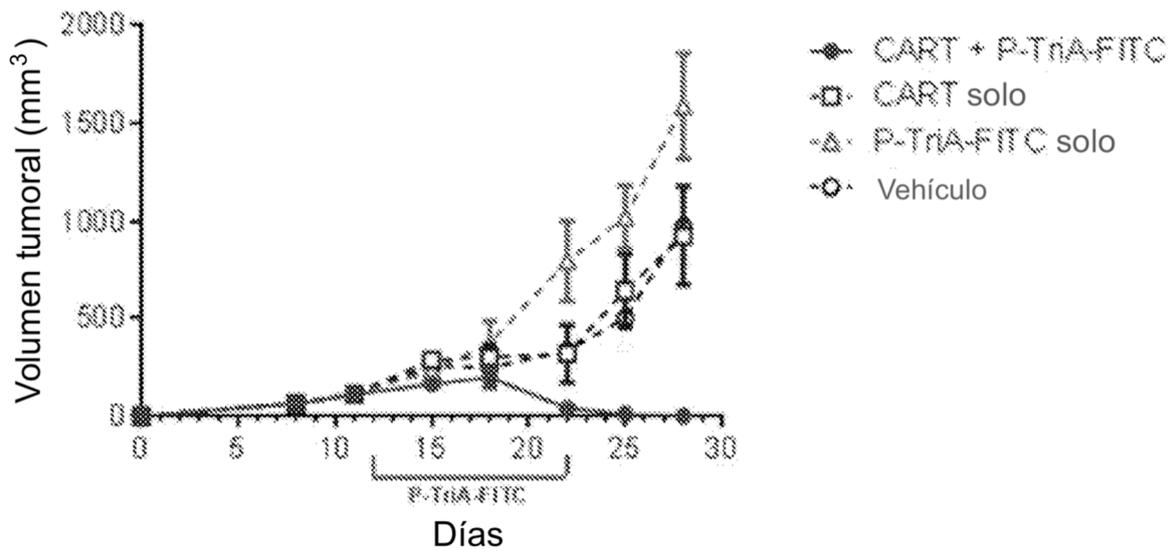


FIG. 14

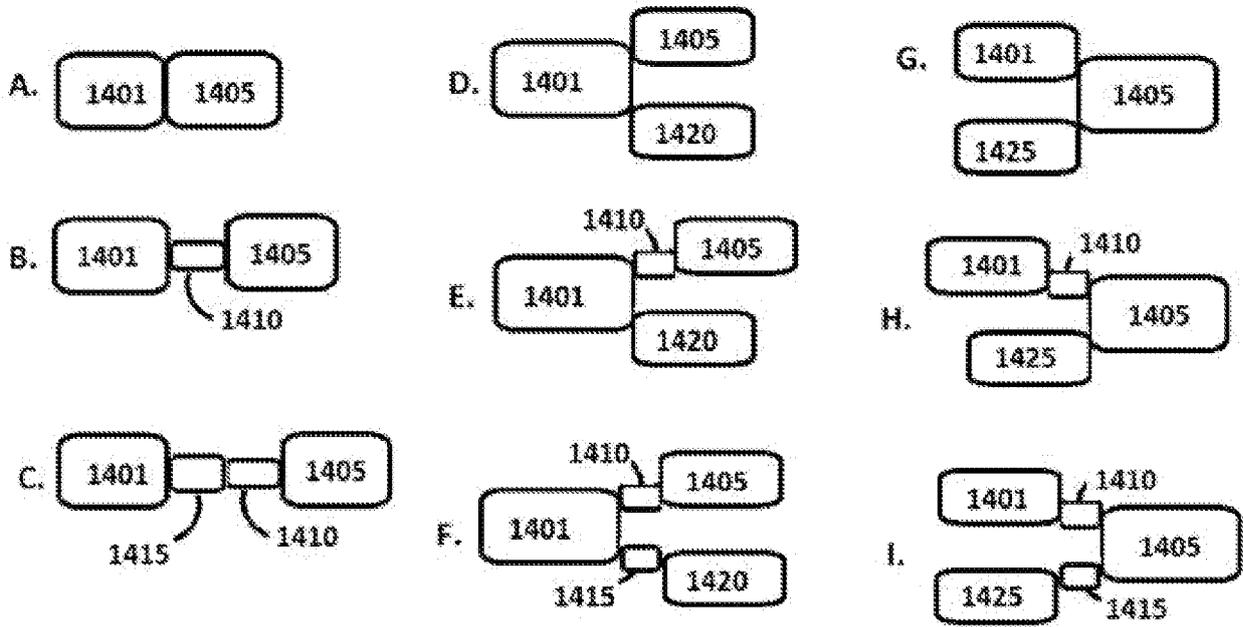


FIG. 15

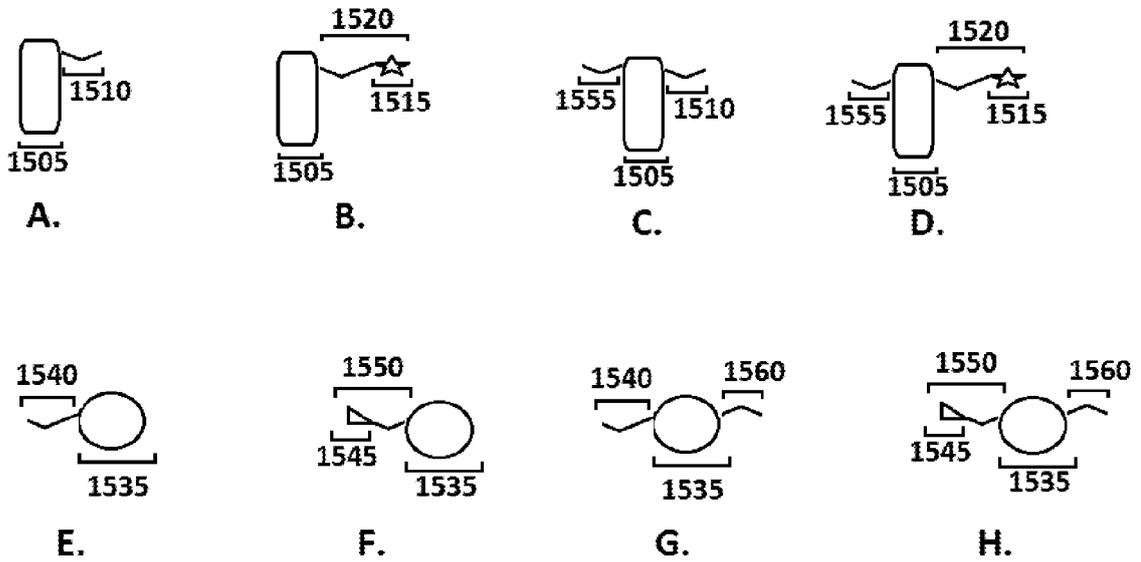


FIG. 16

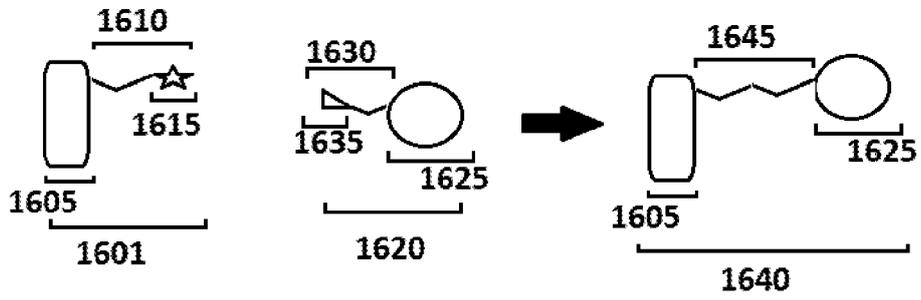


FIG. 17

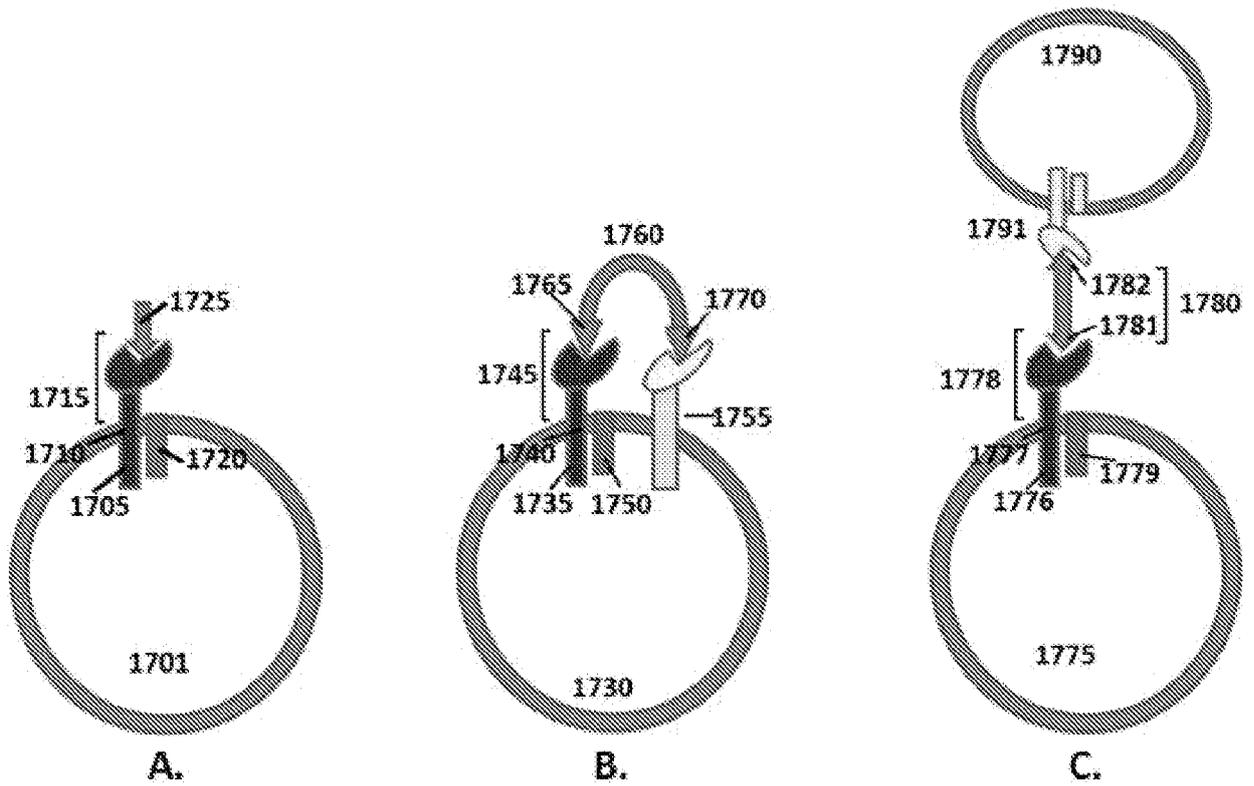


FIG. 18

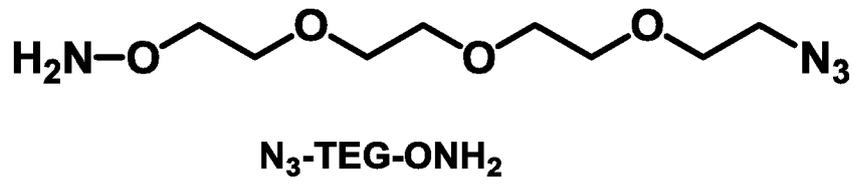
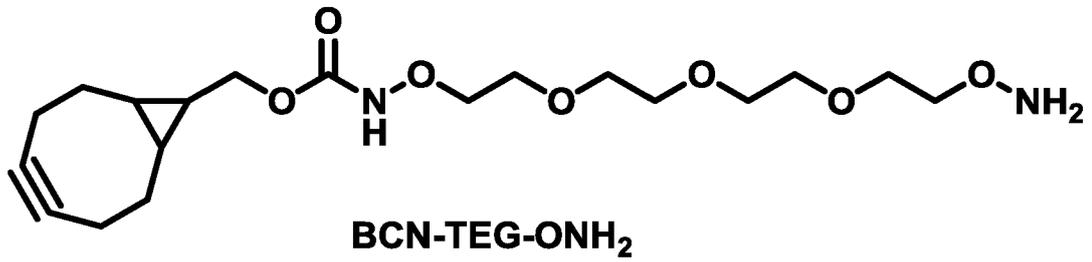


FIG. 19

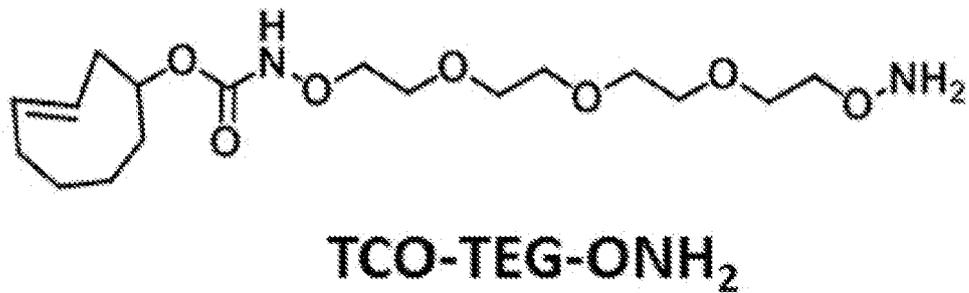
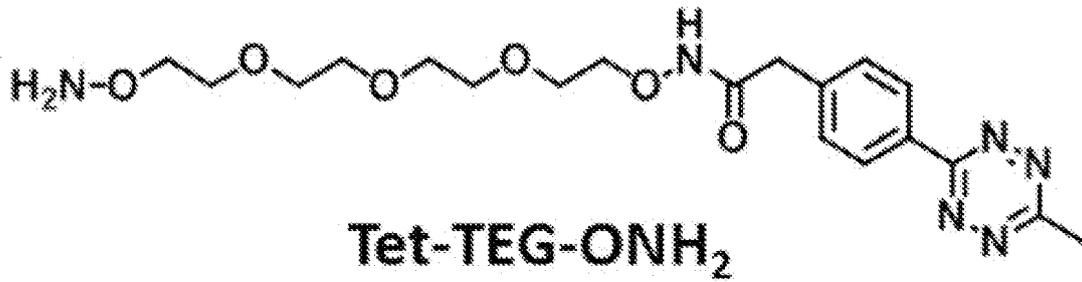


FIG. 20

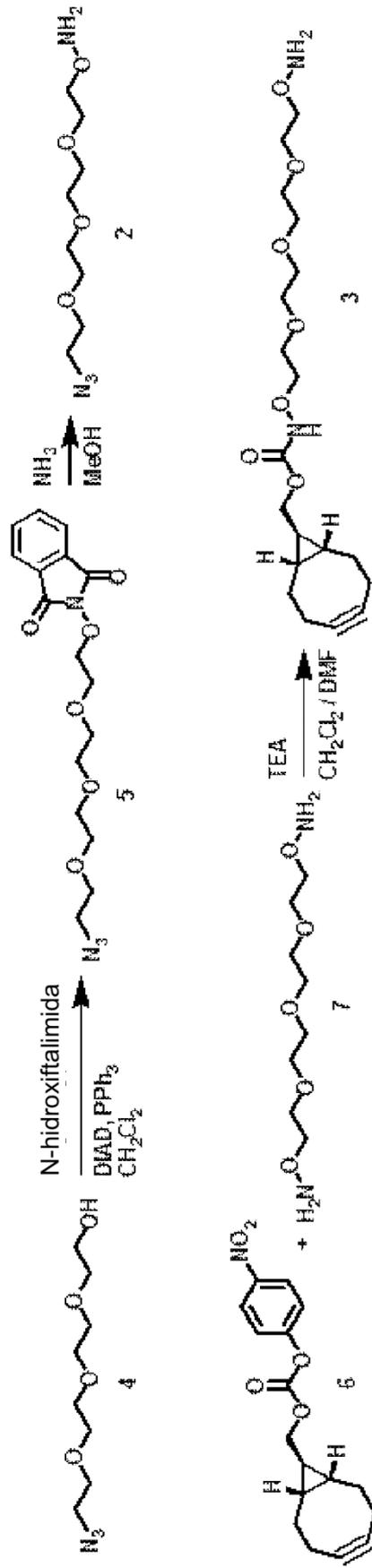


FIG. 21

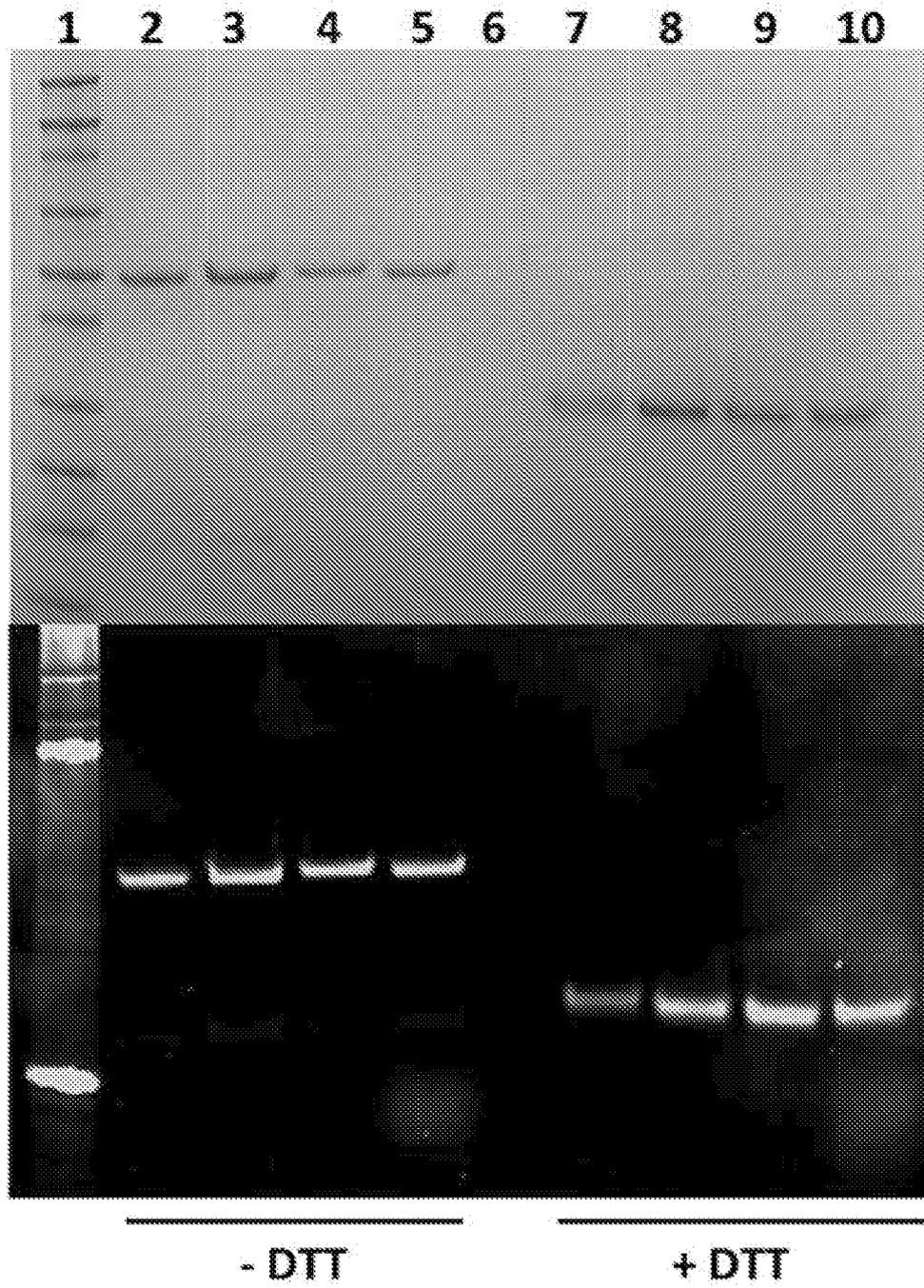


FIG. 22A-D

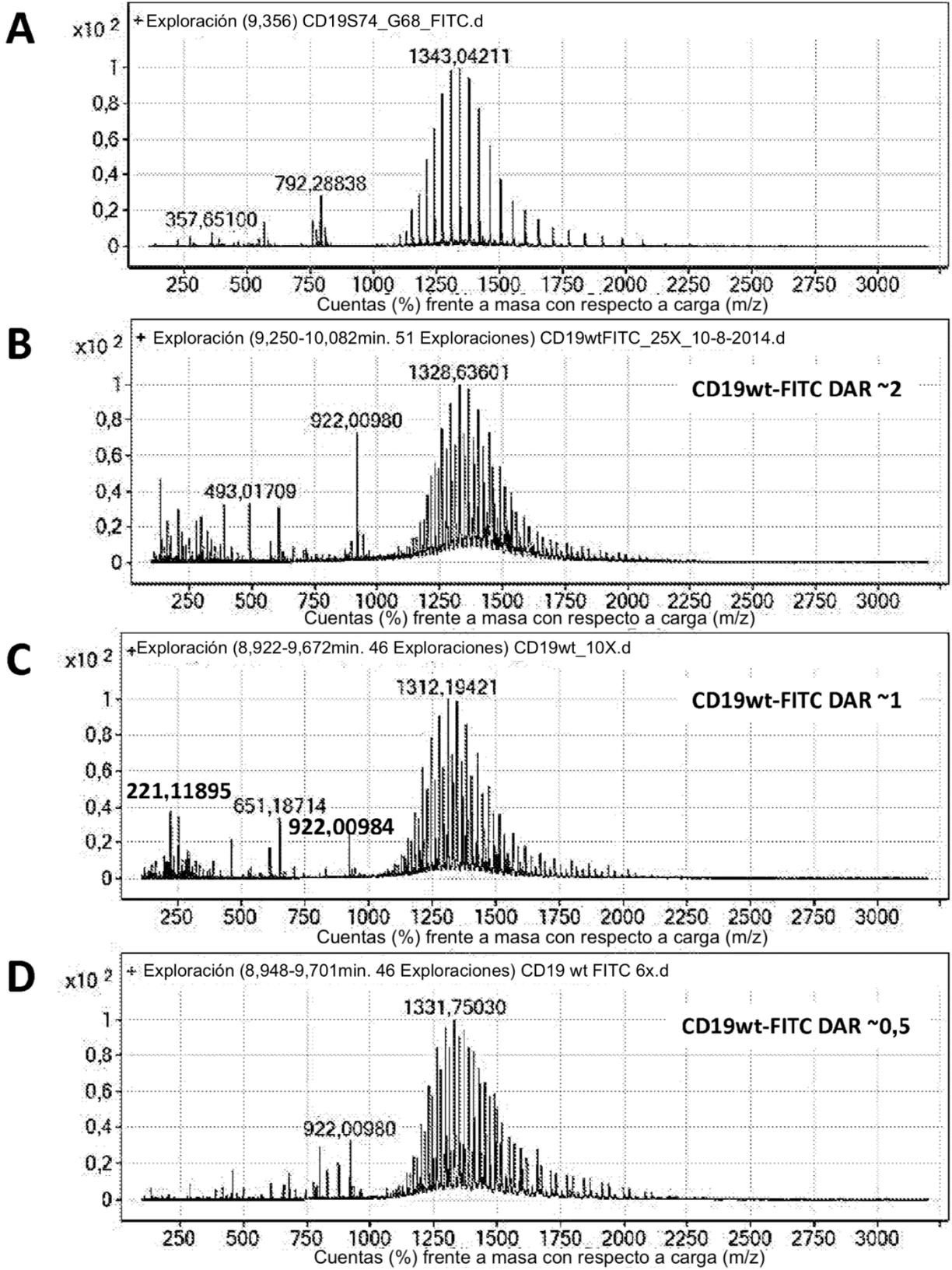


FIG. 22E-H

