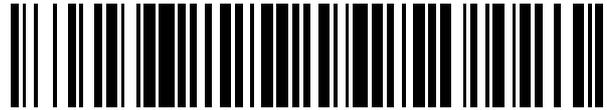


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 224**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/725** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2016 PCT/EP2016/073792**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.04.2017 WO17060300**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2016 E 16777681 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3359563**

54 Título: **Receptores de antígeno y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**07.10.2015 WO PCT/EP2015/073156**

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

**16.03.2020**

73 Titular/es:

**BIONTECH CELL & GENE THERAPIES GMBH  
(50.0%)**

**An der Goldgrube 12**

**55131 Mainz, DE y**

**TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER**

**UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES**

**GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ GMBH**

**(50.0%)**

72 Inventor/es:

**VOSS, RALF HOLGER;**

**SAHIN, UGUR;**

**THEOBALD, MATTHIAS;**

**SIMON, PETRA y**

**BIRTEL, MATTHIAS**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 748 224 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Receptores de antígeno y usos de los mismos

Campo técnico

5 La presente enseñanza se refiere a receptores de antígenos recombinantes y usos de los mismos. Las células T diseñadas para expresar a tales receptores de antígeno son útiles en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la expresión de uno o más antígenos unidos por los receptores de antígeno.

Antecedentes

10 Las células T desempeñan un papel central en la inmunidad celular en humanos y en animales. El reconocimiento y la unión de un antígeno en particular está mediado por los receptores de células T (RCTs) expresados en la superficie de las células T. El RCT de una célula T es capaz de interactuar con péptidos inmunogénicos (epítopes) unidos a las moléculas del complejo de histocompatibilidad principal (CHP) y presentados en la superficie de las células diana. La unión específica del RCT desencadena una cascada de señalización dentro de la célula T que conduce a la proliferación y a la diferenciación hacia una célula T efectora madura.

15 El RCT es parte de una compleja maquinaria de señalización, que incluye a el complejo heterodimérico de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del RCT, el correceptor CD4 o CD8 y el módulo de transducción de señales CD3 (Figura 1). El heterodímero  $\alpha/\beta$  del RCT es responsable por el reconocimiento del antígeno y por la transmisión de la señal de activación a través de la membrana celular junto con CD3, mientras que las cadenas CD3 transfieren la señal entrante a las proteínas adaptadoras dentro de la célula. Por lo tanto, la transferencia de las cadenas RCT  $\alpha/\beta$  ofrece la oportunidad de redirigir a las células T hacia cualquier antígeno de interés.

20 La inmunoterapia basada en transferencia de células adoptivas (TCA) se puede definir ampliamente como una forma de inmunización pasiva con células T previamente sensibilizadas que se transfieren a receptores no inmunes o al huésped autólogo después de la expansión *ex vivo* desde bajas frecuencias precursoras a números de celdas clínicamente relevantes. Los tipos de células que se han utilizado para los experimentos de TCA incluyen células asesinas activadas por linfocinas (AAL) (Mule, J.J et al. (1984) Science 225, 1487-1489; Rosenberg, S.A. et al. (1985) N. Engl. J. Med. 313, 1485-1492), linfocitos infiltrantes de tumores (LIT) (Rosenberg, S.A. et al. (1994) J. Natl. Cancer Inst. 86, 1159-1166), linfocitos de donantes después del trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) así como líneas celulares T específicas tumorales o clones (Dudley, M.E. et al. (2001) J. Immunother. 24, 363-373; Yee, C. et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. US A 99, 16168-16173). Se demostró que la transferencia de células T adoptivas tiene actividad terapéutica contra infecciones virales humanas como el CMV. Para la inmunoterapia adoptiva del melanoma, Rosenberg y sus colegas establecieron un enfoque de TCA basado en la infusión de linfocitos autólogos infiltrantes de tumores (LIT) expandidos *in vitro*, aislados de tumores extirpados en combinación con una quimioterapia linfoagulante no mieloablativa y dosis altas de IL2. Un estudio clínico dio como resultado una tasa de respuesta objetiva de aproximadamente el 50% de los pacientes tratados que padecían un melanoma metastásico (Dudley, M.E. et al. (2005) J. Clin. Oncol. 23: 2346-2357).

35 Un enfoque alternativo es la transferencia adoptiva de células T autólogas reprogramadas para expresar a un inmunoreceptor reactivo de tumor de especificidad definida durante un cultivo *ex vivo* a corto plazo seguido de una reinfusión en el paciente (Kershaw M.H. et al. (2013) Nature Reviews Cancer 13 (8): 525-41). Esta estrategia hace que la TCA sea aplicable a una variedad de neoplasias malignas comunes, incluso si las células T reactivas a tumores están ausentes en el paciente. Dado que la especificidad antigénica de las células T se basa completamente en el complejo heterodimérico de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de RCT, la transferencia de genes RCT clonados a las células T ofrece el potencial de redirigirlas hacia cualquier antígeno de interés. Por lo tanto, la terapia génica de RCT proporciona una estrategia atractiva para desarrollar inmunoterapia específica de antígeno con linfocitos autólogos como una opción de tratamiento. Las principales ventajas de la transferencia de genes RCT son la creación de cantidades terapéuticas de células T específicas de antígeno en unos pocos días y la posibilidad de introducir especificidades que no están presentes en el repertorio del RCT endógeno del paciente. Varios grupos demostraron que la transferencia de genes RCT es una estrategia atractiva para redirigir la especificidad antigénica de las células T primarias (Morgan, R. A et al. (2003) J. Immunol. 171, 3287-3295; Cooper, L.J. et al. (2000) J. Virol. 74, 8207-8212; Fujio, K. et al. (2000) J. Immunol. 165, 528-532; Kessels, H.W. et al. (2001) Nat. Immunol. 2, 957-961; Dembic, Z. et al. (1986) Nature 320, 232-238). La viabilidad de la terapia génica RCT en humanos se demostró inicialmente en ensayos clínicos para el tratamiento del melanoma maligno por Rosenberg y su grupo. La transferencia adoptiva de linfocitos autólogos transducidos retroviralmente con RCTs antígeno específicos de melanoma/melanocito, resultó en la regresión del cáncer en hasta el 30% de los pacientes tratados por un melanoma (Morgan, R.A. et al. (2006) Science 314, 126-129; Johnson, L.A. et al. (2009) Blood 114, 535-546). Mientras tanto, las pruebas clínicas de la terapia génica con RCT se extendieron también a otros tipos de cáncer además del melanoma dirigido a muchos antígenos tumorales distintos (Park, T.S. et al., (2011) Trends Biotechnol. 29, 550-557).

El uso de enfoques de ingeniería genética para insertar receptores dirigidos a antígenos de especificidad definida en células T ha ampliado enormemente las capacidades potenciales de TCA. Los receptores de antígeno quimérico (RAQs) son un tipo de receptor dirigido hacia el antígeno compuesto por dominios de señalización de células T

intracelulares fusionados a dominios de unión al antígeno extracelular, más comúnmente fragmentos variables de cadena sencilla (Fvcs) de anticuerpos monoclonales. Los RAQ reconocen directamente a los antígenos de la superficie celular, independientemente de la presentación mediada por CHP, lo que permite el uso de una construcción de receptor único específica para cualquier antígeno dado en todos los pacientes. Los RAQ iniciales fusionaron dominios de reconocimiento de antígeno a la cadena de activación CD3 $\zeta$  del complejo receptor de células T (RCT) (Figura 2). Las iteraciones RAQ posteriores han incluido señales coestimuladoras secundarias en conjunto con CD3 $\zeta$ , incluidos los dominios intracelulares de CD28 o una variedad de moléculas de la familia de receptores de FNT como 4-1BB (CD137) y OX40 (CD134). Además, los receptores de tercera generación incluyen dos señales coestimuladoras además de CD3 $\zeta$ , más comúnmente de CD28 y 4-1BB. Los RAQ de segunda y de tercera generación mejoraron drásticamente la eficacia antitumoral *in vitro* e *in vivo* (Zhao et al., (2009) J. Immunol., (183) 5563-5574), en algunos casos induciendo remisiones completas en pacientes con cáncer avanzado (Porter et al. al., (2011) N.Engl.J.Med., (365) 725-733).

Un RAQ clásico consiste en un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla (Fvcs) específico de antígeno, fusionado a un dominio transmembranal y de señalización tal como CD3 $\zeta$ . Tras la introducción en las células T, se expresa como una proteína unida a la membrana e induce respuestas inmunes al unirse a su antígeno cognado (Eshhar et al., (1993) PNAS, (90) 720-724). La respuesta inmune específica inducida del antígeno da como resultado la activación de las células T CD8+ citotóxicas que a su vez conduce a la erradicación de las células que expresan a el antígeno específico, como las células tumorales o las células infectadas por virus que expresan a el antígeno específico. Sin embargo, estas construcciones de RAQ clásicas no activan/estimulan a las células T a través de su complejo CD3 endógeno, que normalmente es esencial para la activación de las células T. Debido a la fusión del dominio de unión al antígeno con CD3 $\zeta$ , la activación de las células T se induce a través de un "cortocircuito" bioquímico (Aggen et al., (2012) Gene Therapy, (19) 365-374). Esta activación no fisiológica de las células T a través de este cortocircuito bioquímico es riesgoso para el paciente tratado de esta manera, ya que la sobreactivación de las células T puede provocar efectos secundarios no deseados. Por ejemplo, la activación basal a largo plazo de las células T recombinantes debido a la expresión de RAQ se ha observado *in vitro* ("señalización tónica"), lo que resultó en una mayor acumulación de moléculas inhibitorias, como LAG-3, TIM-3 y PD-1, en la superficie de las células T recombinantes que expresan RAQ, lo que a su vez resultó en células T agotadas prematuramente, lo que posteriormente condujo a un fuerte impacto negativo en la respuesta contra las células tumorales *in vivo* (Long et al., (2015) Nat. Med, (21) 581-590). Esta reacción adversa se ha asociado con una agrupación irregular de fragmentos Fvcs a través de residuos marco de este anticuerpo. Además, aunque las construcciones clásicas de RAQ de este tipo se han probado con éxito contra diferentes neoplasias, como la leucemia (Porter et al., (2011) N.Engl.J.Med., (365) 725-733), también han resultado en enfermedades autoinmunes fatales debido a la expresión basal del antígeno dirigido (antígeno tumoral dirigido) en tejidos normales (reacción dentro de la diana/fuera del tumor; Morgan et al., (2010) Mol Ther., (18) 843-51).

Un enfoque alternativo, en el que la activación de la célula T se produce a través de un mecanismo más fisiológico, fue la provisión de un fragmento análogo de RCT de cadena sencilla (Tvcs) fusionado al dominio constante C $\beta$  derivado del receptor de células T (RCT) y su co-expresión con un dominio constante C $\alpha$  derivado de RCT (Voss et al., (2010) Blood, (115) 5154-5163), este último que recluta a el homodímero de CD3 $\zeta$  endógeno esencial (Call et al., (2002) Cell, (111) 967-79.). Sin embargo, para que estas construcciones funcionen como activadores del sistema inmune, era esencial que los dominios constantes derivados del RCT se derivaran de los RCT de los ratones o se murinizaran, Cohen et al., (2006) Cancer Res., (66) 8878-86) para lograr el emparejamiento de la cadena entre el RCTcs y C $\alpha$ . El hecho de que estas construcciones deban tener secuencias xenogénicas para su funcionalidad aumenta el riesgo de que el sistema inmune reaccione contra ellas cuando se administran y disminuye o destruye su efectividad terapéutica.

Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar receptores de antígeno recombinantes alternativos, en los que, por ejemplo, el receptor, al unirse al antígeno, sea lo suficientemente capaz de activar a la célula T en la que se expresa de manera fisiológica normal a través del complejo CD3 endógeno y, opcionalmente, sin necesidad de la presencia de ninguna secuencia de aminoácidos que no sea de origen humano, al menos en el dominio de transmisión de señal del receptor de antígeno, que podría inducir una respuesta inmune no deseada contra el receptor de antígeno recombinante.

## 50 Descripción

### Sumario

La invención es como se define en las reivindicaciones.

La presente enseñanza se refiere a receptores de antígeno recombinantes que tienen al menos dos sitios de unión al antígeno. Los receptores de antígeno comprenden dos cadenas peptídicas. En un aspecto, las cadenas peptídicas comprenden cada una al menos dos dominios, además de un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora, en el que cada uno de los dos dominios en una cadena peptídica forma un sitio de unión al antígeno con uno de los dominios en la otra cadena peptídica. En otro aspecto, una de las cadenas peptídicas tiene al menos cuatro dominios, además de un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora, en el que dos de los cuatro dominios forman dos sitios de unión al antígeno con los dos dominios restantes en la misma cadena peptídica.

En un aspecto, la presente enseñanza se refiere a un receptor de antígeno, cuyo receptor comprende una primera cadena peptídica y una segunda cadena peptídica, en el que la primera cadena peptídica comprende al menos un primer y un segundo dominio, y un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora; la segunda cadena peptídica comprende al menos un primer y un segundo dominio, y un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora; en el que el primer dominio de la primera cadena peptídica se forma junto con uno de los dominios de la segunda cadena peptídica un primer sitio de unión al antígeno, y en el que el segundo dominio de la primera cadena peptídica se forma junto con el otro dominio de la segunda cadena peptídica un segundo sitio de unión al antígeno. En el receptor de antígeno de este aspecto, los dominios que forman los sitios de unión al antígeno respectivos se ubican preferiblemente en diferentes cadenas peptídicas. En consecuencia, los sitios de unión al antígeno se forman por la interacción intermolecular de los dominios.

En una realización, el primer y/o el segundo dominio comprenden cada uno una región variable de una cadena de inmunoglobulina o una región variable de una cadena de receptor de células T o una porción de la región variable.

En una realización, uno de los dominios que forman el primer sitio de unión al antígeno comprende una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina con una especificidad para un antígeno o una porción del mismo y el otro dominio que forma a el primer sitio de unión al antígeno comprende una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina con una especificidad para el antígeno o una porción del mismo. En una realización, uno de los dominios que forman a el segundo sitio de unión al antígeno comprende una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina con una especificidad para un antígeno o una porción del mismo y el otro dominio que forma el segundo sitio de unión al antígeno comprende una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina con una especificidad para el antígeno o una porción del mismo.

En una realización, el primer dominio de la primera cadena peptídica comprende una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina con una especificidad para un antígeno o una porción del mismo y el dominio de la segunda cadena peptídica que forma un sitio de unión al antígeno con el primer dominio de la primera cadena peptídica comprende una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina con una especificidad por el antígeno o una porción del mismo. En una realización, el segundo dominio de la primera cadena peptídica comprende una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina con una especificidad para un antígeno o una porción del mismo y el dominio de la segunda cadena peptídica que forma un sitio de unión al antígeno con el segundo dominio de la primera cadena peptídica comprende una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina con una especificidad para el antígeno o una porción del mismo.

En una realización, el primer y el segundo dominio de la primera cadena peptídica comprenden cada uno una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina o una porción de la misma; y el primer y el segundo dominio de la segunda cadena peptídica comprenden cada uno una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina o una porción de la misma.

En una realización, el dominio N-terminal de la primera cadena peptídica forma junto con el dominio N-terminal de la segunda cadena peptídica un sitio de unión al antígeno; y el dominio C-terminal de la primera cadena peptídica forma junto con el dominio C-terminal de la segunda cadena peptídica un sitio de unión al antígeno.

En una realización, el dominio N-terminal de la primera cadena peptídica forma junto con el dominio C-terminal de la segunda cadena peptídica un sitio de unión al antígeno; y el dominio C-terminal de la primera cadena peptídica forma junto con el dominio N-terminal de la segunda cadena peptídica un sitio de unión al antígeno.

En un aspecto, la presente enseñanza se refiere a un receptor de antígeno, cuyo receptor comprende una primera cadena peptídica y una segunda cadena peptídica, en el que la primera cadena peptídica comprende al menos cuatro dominios y un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora; la segunda cadena peptídica comprende un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora; en el que dos de los dominios de la primera cadena peptídica forman un primer sitio de unión al antígeno, y en el que los otros dos dominios de la primera cadena peptídica forman un segundo sitio de unión al antígeno. En el receptor de antígeno de este aspecto, los dominios que forman a los sitios de unión al antígeno respectivos se ubican preferiblemente en la misma cadena peptídica. En consecuencia, los sitios de unión al antígeno se forman por la interacción intramolecular de dominios.

En una realización, los cuatro dominios comprenden cada uno una región variable de una cadena de inmunoglobulina o una región variable de una cadena de receptor de células T o una porción de la región variable.

En una realización, uno de los dominios que forman el primer sitio de unión al antígeno comprende una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina con una especificidad para un antígeno o una porción del mismo y el otro dominio que forma el primer sitio de unión al antígeno comprende una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina con una especificidad para el antígeno o una porción del mismo. En una realización, uno de los dominios que forman el segundo sitio de unión al antígeno comprende una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina con una especificidad para un antígeno o una porción del mismo y el otro dominio que forma el segundo sitio de unión al antígeno comprende una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina con una especificidad para el antígeno o una porción del mismo.

En una realización, los dos dominios N-terminales de los cuatro dominios forman juntos un sitio de unión al antígeno; y los dos dominios C-terminales de los cuatro dominios forman juntos un sitio de unión al antígeno.

5 En una realización, uno de los dos dominios N-terminales de los cuatro dominios comprende una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina o una porción de la misma y el otro de los dos dominios N-terminales de los cuatro dominios comprende una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina o una porción de la misma; y uno de los dos dominios C-terminales de los cuatro dominios comprende una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina o una porción de la misma y el otro de los dos dominios C-terminales de los cuatro dominios comprende una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina o una porción de la misma.

10 En una realización de los receptores de antígeno de la enseñanza, el dominio de transmisión de señal del inmunoreceptor comprende una región constante o invariable de una cadena de receptor de las células T o una región constante o invariable de una cadena de receptor de Fc de una célula inmune o una porción de la constante o región invariable. En una realización de los receptores de antígeno de la enseñanza, (i) la primera cadena peptídica comprende una región constante de una cadena alfa del receptor de células T o una porción de la misma y la segunda cadena peptídica comprende una región constante de una cadena beta del receptor de células T o una porción de la misma, o (ii) la primera cadena peptídica comprende una región constante de una cadena beta del receptor de células T o una porción de la misma y la segunda cadena peptídica comprende una región constante de una cadena alfa del receptor de células T o una porción de la misma.

En una realización de los receptores de antígeno de la enseñanza, el dominio de transmisión de señal del inmunoreceptor es de origen humano.

20 En una realización, un receptor de antígeno de la enseñanza comprende (a) enlazador(es) conectando dominios del receptor de antígeno. En una realización, un receptor de antígeno de la enseñanza comprende uno o más enlazadores entre los dominios que forman los sitios de unión al antígeno y/o entre los dominios que forman los sitios de unión al antígeno y los dominios de transmisión de la señal del inmunoreceptor. El enlazador puede ser una secuencia de aminoácidos arbitraria de cualquier longitud siempre que no interfiera con las funciones del receptor de antígeno, como la capacidad del receptor de antígeno para unirse al antígeno o para asociarse con el complejo CD3 endógeno, o interferir con la capacidad del receptor de antígeno para inducir una respuesta inmune al unirse al antígeno.

30 En una realización de los receptores de antígeno de la enseñanza, el primer y el segundo sitio de unión al antígeno se unen al mismo antígeno o se unen a diferentes antígenos. En una realización de los receptores de antígeno de la enseñanza, el primer y el segundo sitio de unión al antígeno se unen a diferentes epítopes en el mismo antígeno. En consecuencia, mientras que los dominios que forman a el primer sitio de unión al antígeno se derivan preferiblemente de la misma inmunoglobulina y los dominios que forman el segundo sitio de unión al antígeno se derivan preferiblemente de la misma inmunoglobulina, los dominios que forman el primer sitio de unión al antígeno y los dominios que forman el segundo antígeno el sitio de unión se derivan de las mismas o de diferentes inmunoglobulinas, dichas inmunoglobulinas diferentes se unen al mismo o a diferentes antígenos.

35 En una realización, el antígeno es un antígeno específico de para una enfermedad, preferiblemente un antígeno tumoral. En una realización, el antígeno se expresa en la superficie de una célula.

40 En un aspecto, la presente enseñanza se refiere a una cadena peptídica de cualquiera de los receptores de antígeno de la enseñanza. En una realización, la presente enseñanza se refiere a una cadena peptídica que comprende un primer y un segundo dominio que comprenden cada uno una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina o una porción de la misma o cada uno comprende una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina o una porción de la misma y en donde la cadena peptídica comprende además un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora. En una realización, la presente enseñanza se refiere a una cadena peptídica que comprende al menos a cuatro dominios, y un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora, en el que dos de los dominios de la cadena peptídica forman un primer sitio de unión al antígeno, y los otros dos dominios de la cadena peptídica forman un segundo sitio de unión al antígeno. Otras realizaciones de las cadenas peptídicas de la enseñanza son como se describen en la presente memoria para los receptores de antígeno de la enseñanza.

50 En un aspecto, la presente enseñanza se refiere a una célula, en particular a una célula efectora inmune tal como una célula T, genéticamente modificada para expresar un receptor de antígeno de la enseñanza. En un aspecto, la presente enseñanza se refiere a una célula recombinante, en particular a una célula efectora inmune tal como una célula T, que expresa la primera cadena peptídica, la segunda cadena peptídica o las cadenas peptídicas primera y segunda de un receptor de antígeno de la enseñanza o expresar una cadena peptídica de la enseñanza. Otras realizaciones de la célula o célula recombinante de la enseñanza son como se describen en la presente memoria para los receptores de antígeno de la enseñanza o las cadenas peptídicas de la enseñanza.

55 En un aspecto, la presente enseñanza se refiere a una célula, en particular una célula inmune efectora como sería una célula T genéticamente modificada para expresar un receptor de antígeno de la enseñanza. En un aspecto, la presente enseñanza se refiere a una célula recombinante, en particular una célula inmune efectora como sería una célula T, expresando la primera cadena peptídica, la segunda cadena peptídica o tanto la primera como la segunda cadena peptídica del receptor de antígeno de la enseñanza o expresando una cadena peptídica de la enseñanza.

Otras realizaciones de la célula o de la célula recombinante de la enseñanza son como se describen en la presente memoria para los receptores de antígeno de la enseñanza o las cadenas peptídicas de la enseñanza.

En un aspecto, la presente enseñanza se refiere a un método para producir una célula que expresa un receptor de antígeno de la enseñanza, el método comprende: (a) proporcionar una célula; (b) proporcionar una primera construcción genética que codifica para la primera cadena peptídica de un receptor de antígeno de la enseñanza; (c) proporcionar una segunda construcción genética que codifica para la segunda cadena peptídica de un receptor de antígeno de la enseñanza; (d) introducir las construcciones genéticas primera y segunda en la célula; y (e) permitir que las construcciones se expresen en la célula. En una realización, la presente enseñanza se refiere a un método para producir una célula que expresa un receptor de antígeno cuyo receptor comprende una primera cadena peptídica y una segunda cadena peptídica, comprendiendo el método: (a) proporcionar una célula; (b) proporcionar una primera construcción genética que codifica para la primera cadena peptídica que comprende al menos un primer y un segundo dominio, y un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora; (c) proporcionar una segunda construcción genética que codifica para la segunda cadena peptídica que comprende al menos un primer y un segundo dominio y un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora; (d) introducir las construcciones genéticas primera y segunda en la célula; y (e) permitir que las construcciones se expresen en la célula; en el que el primer dominio de la primera cadena peptídica puede formar junto con uno de los dominios de la segunda cadena peptídica un primer sitio de unión al antígeno, y en donde el segundo dominio de la primera cadena peptídica puede formar junto con el otro dominio la segunda cadena peptídica es un segundo sitio de unión al antígeno. En una realización, la presente enseñanza se refiere a un método para producir una célula que expresa un receptor de antígeno cuyo receptor comprende una primera cadena peptídica y una segunda cadena peptídica, comprendiendo el método: (a) proporcionar una célula; (b) proporcionar una primera construcción genética que codifica para la primera cadena peptídica que comprende al menos cuatro dominios, y un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora; (c) proporcionar una segunda construcción genética que codifica para la segunda cadena peptídica que comprende un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora; (d) introducir las construcciones genéticas primera y segunda en la célula; y (e) permitir que las construcciones se expresen en la célula; en el que dos de los dominios de la primera cadena peptídica pueden formar un primer sitio de unión al antígeno, y en el que los otros dos dominios de la primera cadena peptídica pueden formar un segundo sitio de unión al antígeno. En una realización de los métodos de la enseñanza, la expresión del receptor de antígeno está en la superficie celular. En una realización de los métodos de la enseñanza, la primera cadena peptídica y la segunda cadena peptídica se proporcionan en una única construcción genética. En una realización de los métodos de enseñanza, la célula es una célula humana. En una realización de los métodos de la enseñanza, la célula es una célula efectora inmune tal como una célula T. En una realización de los métodos de la enseñanza, las construcciones genéticas comprenden ADN y/o ARN. Otras realizaciones de los métodos de la enseñanza son como se describen en la presente memoria para los receptores de antígeno de la enseñanza.

En un aspecto, la presente enseñanza se refiere a una célula recombinante, en particular a una célula efectora inmune tal como una célula T, producida por los métodos de la enseñanza para producir una célula que expresa un receptor de antígeno. Realizaciones adicionales de la célula recombinante de la enseñanza son como se describen en la presente memoria para los receptores de antígeno de la enseñanza o los métodos de la enseñanza para producir una célula que expresa un receptor de antígeno.

En un aspecto, la presente enseñanza se refiere a un ácido nucleico tal como ADN o ARN que codifican para la primera cadena peptídica, la segunda cadena peptídica o las cadenas peptídicas primera y segunda de un receptor de antígeno de la enseñanza o que codifica una cadena peptídica de la enseñanza. Otras realizaciones del ácido nucleico de la enseñanza son como se describen en la presente memoria para los receptores de antígeno de la enseñanza o las cadenas de péptidos de la enseñanza.

La presente enseñanza generalmente abarca el tratamiento de enfermedades dirigidas a células que expresan uno o más antígenos en la superficie celular, tales como células enfermas que expresan uno o más antígenos específicos de enfermedades en la superficie celular, en particular células cancerígenas que expresan uno o más antígenos tumorales en la superficie celular utilizando receptores de antígenos de la enseñanza. Los métodos prevén la erradicación selectiva de las células que expresan en su superficie uno o más antígenos, minimizando así los efectos adversos para las células normales que no expresan el (los) antígeno(s). En una realización, se administran células T genéticamente modificadas para expresar un receptor de antígeno de la enseñanza dirigida a las células a través de la unión al (a los) antígeno(s). Las células T pueden reconocer las células enfermas que expresan el (los) antígeno(s) en la superficie celular, lo que resulta en la erradicación de las células enfermas. En una realización, la población de células diana o tejido diana son células tumorales o tejido tumoral.

En un aspecto, la presente enseñanza se refiere a una composición farmacéutica que comprende a el receptor de antígeno de la enseñanza, la célula recombinante de la enseñanza o el ácido nucleico de la enseñanza; y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica de la enseñanza puede utilizarse como un medicamento, en particular en el tratamiento de una enfermedad tal como el cáncer, caracterizado por la expresión de uno o más antígenos que están unidos por el receptor de antígeno de la enseñanza tal como uno o más antígenos tumorales.

En un aspecto, la presente enseñanza se refiere a un método para tratar una enfermedad tal como el cáncer que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la

enseñanza, en el que la enfermedad se caracteriza por la expresión de al menos un antígeno tal como un antígeno tumoral que está unido por el receptor de antígeno.

5 En un aspecto, la presente enseñanza se refiere a un método para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociada con la expresión o expresión elevada de al menos un antígeno, el método comprende administrar al sujeto células T genéticamente modificadas para expresar un receptor de antígeno de la enseñanza dirigido a al menos un antígeno. En una realización, la enfermedad, trastorno o afección es cáncer. En una realización, las células T pueden ser autólogas, alogénicas o singénicas al sujeto.

10 En una realización de la enseñanza, el receptor de antígeno se une a un solo antígeno (por ejemplo, siendo mono-específico y reconociendo el mismo epítipo o siendo bio-específico o multi-específico y reconociendo diferentes epítipos en el mismo antígeno) o se une a diferentes antígenos, en particular a dos antígenos diferentes.

15 En una realización de todos los aspectos de la enseñanza, el método de tratamiento comprende además obtener una muestra de células de un sujeto, la muestra que comprende células T o progenitores de células T, y transfectar a las células con un ácido nucleico que codifica para el receptor de antígeno de la enseñanza para proporcionar células T genéticamente modificadas para expresar a el receptor de antígeno. En una realización de todos los aspectos de la enseñanza, las células T genéticamente modificadas para expresar a el receptor de antígeno se transfectan de manera estable o transitoria con ácido nucleico que codifica para el receptor de antígeno. Por lo tanto, el ácido nucleico que codifica para el receptor de antígeno está integrado o no integrado en el genoma de las células T. En una realización de todos los aspectos de la enseñanza, las células T y/o la muestra de células son del sujeto al que se administran las células T genéticamente modificadas para expresar a el receptor de antígeno. En una realización de todos los aspectos de la enseñanza, las células T y/o la muestra de células son de un mamífero que es diferente del mamífero al que se administran las células T genéticamente modificadas para expresar el receptor de antígeno.

En una realización de todos los aspectos de la enseñanza, las células T genéticamente modificadas para expresar el receptor de antígeno se inactivan para la expresión de un receptor endógeno de células T y/o HLA endógeno.

25 En una realización de todos los aspectos de la enseñanza, un antígeno se expresa en una célula enferma tal como una célula cancerígena. En una realización, un antígeno se expresa en la superficie de una célula enferma tal como una célula cancerígena. En una realización, un receptor de antígeno se une a un dominio extracelular o a un epítipo en un dominio extracelular de un antígeno. En una realización, un receptor de antígeno se une a epítipos nativos de un antígeno presente en la superficie de las células vivas. En una realización de todos los aspectos de la enseñanza, el antígeno es un antígeno tumoral. En una realización de todos los aspectos de la enseñanza, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en claudinas, tales como claudina 6 y claudina 18.2, CD19, CD20, CD22, CD33, CD123, mesotelina, CEA, c-Met, PSMA, GD-2 y NY-ESO-1. En una realización de todos los aspectos de la enseñanza, el antígeno es un antígeno patógeno. El patógeno puede ser un patógeno fúngico, viral o bacteriano. En una realización de todos los aspectos de la enseñanza, la expresión del antígeno es en la superficie celular. En una realización, un antígeno es una claudina, en particular claudina 6 o claudina 18.2, y dicho receptor de antígeno se une al primer bucle extracelular de dicha claudina. En una realización, la unión de dicho receptor de antígeno cuando es expresado por las células T y/o está presente en las células T a un antígeno presente en las células da como resultado funciones efectoras inmunes de dichas células T, como la liberación de citocinas. En una realización, la unión de dicho receptor de antígeno cuando se expresa por células T y/o está presente en células T a un antígeno presente en células tal como células presentadoras de antígeno da como resultado la estimulación, el cebado y/o la expansión de dichas células T. En una realización, la unión de dicho receptor de antígeno cuando se expresa por las células T y/o está presente en las células T a un antígeno presente en las células enfermas como las células cancerígenas da como resultado la citólisis y/o la apoptosis de las células enfermas, en el que dichas células T preferiblemente liberan factores citotóxicos, por ejemplo, perforinas y granzimas.

45 En una realización de todos los aspectos de la enseñanza, los dominios de un receptor de antígeno que forman sitios de unión al antígeno están compuestos por un exodominio del receptor de antígeno. En una realización de todos los aspectos de la enseñanza, un receptor de antígeno de la enseñanza comprende un dominio transmembranal. En una realización, el dominio transmembranal es una hélice alfa hidrófoba que se extiende a través de la membrana.

50 En una realización de todos los aspectos de la enseñanza, un receptor de antígeno de la enseñanza comprende un péptido señal que dirige a la proteína naciente hacia el retículo endoplásmico. En una realización, el péptido señal precede a los dominios que forman sitios de unión al antígeno.

En una realización de todos los aspectos de la enseñanza, un receptor de antígeno de la enseñanza es preferiblemente específico para el antígeno al que se dirige, en particular cuando está presente en la superficie de una célula tal como una célula enferma o una célula presentadora de antígeno.

55 En una realización de todos los aspectos de la enseñanza, un receptor de antígeno de la enseñanza puede expresarse y/o estar presente en la superficie de una célula T, preferiblemente una célula T citotóxica. En una realización, la célula T es reactiva con el (los) antígeno(s) al que se dirige el receptor de antígeno de la enseñanza.

En otro aspecto, la enseñanza proporciona a los agentes y composiciones descritos en la presente para su uso en los métodos descritos en la presente memoria.

Otras características y ventajas de la enseñanza instantánea serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

#### Descripción detallada

La invención es como se define en las reivindicaciones.

5 Aunque la presente enseñanza se describe en detalle a continuación, debe entenderse que esta enseñanza no está limitada a las metodologías particulares, protocolos y reactivos descritos en la presente memoria, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente enseñanza que estará limitada solo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos  
10 utilizados en la presente tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la materia.

A continuación, se van a describir los elementos de la presente enseñanza. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas, sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Los ejemplos y las realizaciones preferidas descritos de manera diversa no deben interpretarse para limitar a la presente enseñanza solo a las realizaciones descritas explícitamente. Debe  
15 entenderse que esta descripción soporta y abarca realizaciones que combinan las realizaciones descritas explícitamente con cualquier número de los elementos divulgados y/o preferidos. Además, cualquier permutación y combinación de todos los elementos descritos en esta solicitud deben considerarse divulgados por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto indique lo contrario.

Preferentemente, los términos utilizados en la presente memoria se definen como se describe en " A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl, Eds.,  
20 (1995) Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland.

La práctica de la presente enseñanza empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de bioquímica, biología celular, inmunología y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura en el campo (véase, por ejemplo, Clonación Molecular: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).  
25

A lo largo de esta especificación y las reivindicaciones que le siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprende", y variaciones tales como "comprender" y "comprendiendo", implican la inclusión de un miembro, número entero o etapas o grupo de miembros, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas, aunque  
30 en algunas realizaciones puede ser otro miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas pueden ser excluidos, es decir, el tema consiste en la inclusión de un miembro, número entero o etapa establecido o grupo de miembros, números enteros o etapas. Los términos "un" y "uno" y "el" y referencias similares utilizadas en el contexto de la descripción de la enseñanza (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o sea claramente contradicho por el contexto. La recitación de intervalos de valores en la presente memoria solo pretende servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, cada valor individual se incorpora a la especificación como si se mencionara individualmente en la presente memoria.  
35

Todos los métodos descritos en la presente memoria pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como"), provisto en la presente tiene la intención de ilustrar mejor la enseñanza y no plantea una limitación en el alcance de la invención reivindicada de otra manera. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como que indica un elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.  
40

El término "respuesta inmune" se refiere a una respuesta corporal integrada a un antígeno y preferiblemente se refiere a una respuesta celular inmune o celular, así como una respuesta inmune humoral. La respuesta inmune puede ser protectora/preventiva/profiláctica y/o terapéutica.  
45

"Proporcionando una respuesta inmune" puede significar que no hubo respuesta inmune contra un antígeno diana en particular, célula diana y/o tejido diana antes de proporcionar una respuesta inmune, pero también puede significar que hubo un cierto nivel de respuesta inmune contra un antígeno diana en particular, célula diana y/o tejido diana antes de proporcionar una respuesta inmune y después de proporcionar una respuesta inmune dicha respuesta inmune se potencia. Por lo tanto, "proporcionando una respuesta inmune" incluye "inducir una respuesta inmune" y "potenciar una respuesta inmune". Preferiblemente, después de proporcionar una respuesta inmune en un sujeto, dicho sujeto está protegido contra el desarrollo de una enfermedad tal como una enfermedad cancerígena o la condición de la enfermedad se mejora proporcionando una respuesta inmune. Por ejemplo, se puede proporcionar una respuesta inmune contra un antígeno tumoral en un paciente que tiene una enfermedad cancerígena o en un sujeto que está en riesgo de desarrollar una enfermedad cancerígena. Proporcionar una respuesta inmune en este caso puede significar que la condición de la enfermedad del sujeto mejora, que el sujeto no desarrolle metástasis o  
50  
55

que el sujeto que está en riesgo de desarrollar una enfermedad cancerígena no desarrolle una enfermedad cancerígena.

5 La "inmunidad mediada por células" o "inmunidad celular" o términos similares pretenden incluir una respuesta celular dirigida a células caracterizadas por la expresión de un antígeno, en particular caracterizadas por la presentación de un antígeno con CHP de clase I o clase II. La respuesta celular se relaciona con células llamadas células T o linfocitos T que actúan como "auxiliares" o "asesinos". Las células T auxiliares (también llamadas células T CD4+) juegan un papel central al regular la respuesta inmune y las células asesinas (también llamadas células T citotóxicas, células T citolíticas, células T CD8<sup>+</sup> o CTLs) matan a las células enfermas como las células cancerígenas, previniendo la producción de más células enfermas.

10 El término "antígeno" se refiere a un agente que comprende un epítipo contra el cual se debe generar y/o dirigir una respuesta inmune. Preferiblemente, un antígeno en el contexto de la presente enseñanza es una molécula que, opcionalmente después del procesamiento, induce una reacción inmune, que es preferiblemente específica para el antígeno o las células que expresan a el antígeno, preferiblemente en la superficie celular. El término "antígeno" incluye en particular proteínas y péptidos. Un antígeno es preferiblemente un producto que corresponde o se deriva de un antígeno natural. Tales antígenos naturales pueden incluir o pueden derivarse de alérgenos, virus, bacterias, hongos, parásitos y otros agentes infecciosos y patógenos o un antígeno también puede ser un antígeno tumoral. De acuerdo con la presente enseñanza, un antígeno puede corresponder a un producto natural, por ejemplo, una proteína viral o una parte de la misma.

20 El término "patógeno" se refiere a microorganismos patógenos y comprende virus, bacterias, hongos, organismos unicelulares y parásitos. Ejemplos de virus patógenos son el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el citomegalovirus (CMV), el virus del herpes (VHS), el virus de la hepatitis A (VHA), el VHB, el VHC, el virus del papiloma y el virus linfotrófico T humano (VLTH). Los organismos unicelulares comprenden plasmodios, tripanosomas, amebas, etcétera.

25 En una realización preferida, un antígeno es un antígeno específico de una enfermedad o un antígeno asociado a una enfermedad. El término "antígeno específico de una enfermedad" o "antígeno asociado a una enfermedad" se refiere a todos los antígenos que tienen importancia patológica. En una realización particularmente preferida, el antígeno está presente en células, tejidos y/u órganos enfermos mientras que no está presente o está presente en una cantidad reducida en células, tejidos y/u órganos sanos y, por lo tanto, puede utilizarse para atacar a células enfermas, tejidos y/u órganos, por ejemplo, por las células T que llevan un receptor de antígeno dirigido al antígeno. En una realización, un antígeno específico de una enfermedad o antígeno asociado a una enfermedad está presente en la superficie de una célula enferma.

30 En una realización preferida, un antígeno es un antígeno tumoral o antígeno asociado a un tumor, es decir, un constituyente de células cancerígenas que pueden derivarse del citoplasma, la superficie celular y el núcleo celular, en particular aquellos antígenos que se producen, preferiblemente en gran cantidad, como antígenos de superficie en células cancerígenas.

35 En el contexto de la presente enseñanza, el término "antígeno tumoral" o "antígeno asociado a tumor" se refiere a proteínas que están en condiciones normales expresadas específicamente en un número limitado de tejidos y/u órganos o en etapas de desarrollo específicas, por ejemplo, el antígeno tumoral puede estar en condiciones normales expresadas específicamente en el tejido del estómago, preferiblemente en la mucosa gástrica, en los órganos reproductivos, por ejemplo, en los testículos, en el tejido trofoblástico, por ejemplo, en la placenta o en las células de la línea germinal, y se expresan o se expresan aberrantemente en uno o más tejidos tumorales o cancerígenos. En este contexto, "un número limitado" significa preferiblemente no más de 3, más preferiblemente no más de 2. Los antígenos tumorales en el contexto de la presente enseñanza incluyen, por ejemplo, antígenos de diferenciación, preferiblemente antígenos de diferenciación específicos de tipo celular, es decir, proteínas que están en condiciones normales expresadas específicamente en un determinado tipo celular en una determinada etapa de diferenciación, antígenos de cáncer/testículos, es decir, proteínas que bajo condiciones normales están expresadas específicamente en testículos y, a veces, en placenta, y en antígenos específicos de la línea germinal. En el contexto de la presente enseñanza, el antígeno tumoral se asocia preferiblemente con la superficie celular de una célula cancerígena y preferiblemente no se expresa, o solo rara vez lo hace, en tejidos normales. Preferiblemente, el antígeno tumoral o la expresión aberrante del antígeno tumoral identifica a células cancerígenas. En el contexto de la presente enseñanza, el antígeno tumoral que es expresado por una célula cancerígena en un sujeto, por ejemplo, un paciente que padece una enfermedad cancerígena es preferiblemente una auto-proteína en dicho sujeto. En realizaciones preferidas, el antígeno tumoral en el contexto de la presente enseñanza se expresa bajo condiciones normales específicamente en un tejido u órgano que no es esencial, es decir, tejidos u órganos que cuando están dañados por el sistema inmune no conducen a la muerte del sujeto, o en órganos o estructuras del cuerpo a los que el sistema inmune no tiene acceso o que difícilmente tiene acceso. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del antígeno tumoral es idéntica entre el antígeno tumoral que se expresa en tejidos normales y el antígeno tumoral que se expresa en tejidos cancerígenos.

60 Ejemplos de antígenos tumorales que pueden ser útiles en la presente enseñanza son p53, ART-4, BAGE, beta-catenina/m, RCB-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, las proteínas de la superficie celular de la familia claudina, como CLAUDINA-6, CLAUDINA-18.2 y CLAUDINA-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-

5 AML1, G250, GAGE, GnT- V, Gap100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (o hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE-A, preferiblemente MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE -A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11 o MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART- 1/Melan-A, MC1R, miosina/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, p190 menor RCB-abL, Pm1/RARa, PRAME, proteinasa 3, PSA, PSM, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1,TRP-2, TRP- 2/INT2, TPTE y WT. Los antígenos tumorales particularmente preferidos incluyen CLAUDINA-18.2 (CLDN18.2) y CLAUDINA-6 (CLDN6).

10 El término "CLDN" o simplemente "Cl" como se utiliza en la presente memoria significa claudina e incluye CLDN6 y CLDN18.2. Preferiblemente, una claudina es una claudina humana. Las claudinas son una familia de proteínas que son los componentes más importantes de las uniones estrechas, donde establecen la barrera paracelular que controla el flujo de moléculas en el espacio intercelular entre las células de un epitelio. Las claudinas son proteínas transmembrana que atraviesan a la membrana 4 veces con el extremo N-terminal y el extremo C-ambos ubicados en el citoplasma. El primer circuito extracelular, denominado EC1 o ECL1, consta de un promedio de 53 aminoácidos, y el segundo circuito extracelular, denominado EC2 o ECL2, consta de alrededor de 24 aminoácidos. Las proteínas de la superficie celular de la familia claudina se expresan en tumores de diversos orígenes, y son particularmente adecuadas como estructuras diana en relación con la inmunoterapia dirigida contra el cáncer debido a su expresión selectiva (sin expresión en un tejido normal relevante para la toxicidad) y localización en la membrana plasmática.

20 Se han identificado a CLDN6 y a CLDN18.2 como expresados diferencialmente en tejidos tumorales, siendo el estómago el único tejido normal que expresa a CLDN18.2 (células epiteliales diferenciadas de la mucosa gástrica) y el único tejido normal que expresa a CLDN6 es la placenta.

25 CLDN18.2 se expresa en cánceres de diversos orígenes tales como carcinoma pancreático, carcinoma esofágico, carcinoma gástrico, carcinoma bronquial, carcinoma de mama y tumores ONG. CLDN18.2 es una valiosa diana para la prevención y/o el tratamiento de tumores primarios, como cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, como cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, y cánceres de la vesícula biliar, y metástasis de los mismos, en particular metástasis de cáncer gástrico tales como tumores de Krukenberg, metástasis peritoneal y metástasis de ganglios linfáticos. Los receptores de antígeno dirigidos al menos a CLDN18.2 son útiles en el tratamiento de tales enfermedades cancerígenas.

30 Se ha descubierto que CLDN6 se expresa, por ejemplo, en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer de piel, melanomas, cáncer de cabeza y cuello, sarcomas, cáncer de vías biliares, cáncer de células renales y cáncer de vejiga urinaria. CLDN6 es una diana particularmente preferida para la prevención y/o el tratamiento del cáncer de ovario, en particular el adenocarcinoma de ovario y el teratocarcinoma de ovario, el cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), en particular carcinoma y adenocarcinoma de células pulmonares escamosas, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer de piel, en particular carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular sarcoma y carcinosarcoma sinovial, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga urinaria, en particular carcinoma de células transicionales y carcinoma papilar, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales que incluye carcinoma de células renales de células claras y carcinoma de células renales papilares, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, incluido el cáncer de íleon, en particular adenocarcinoma de intestino delgado y adenocarcinoma de íleon, carcinoma embrionario testicular, coriocarcinoma placentario, cáncer cervical, cáncer testicular, en particular seminoma testicular, teratoma testicular y cáncer testicular embrionario, cáncer uterino, tumores de células germinales como un teratocarcinoma o un carcinoma embrionario, en particular tumores de células germinales de los testículos, y las formas metastásicas de los mismos. Los receptores de antígeno dirigidos al menos a CLDN6 son útiles en el tratamiento de tales enfermedades cancerígenas.

50 En el contexto de las realizaciones de la presente enseñanza, un antígeno está presente preferiblemente en la superficie de una célula, preferiblemente una célula presentadora de antígeno o una célula enferma. De acuerdo con las enseñanzas, un antígeno si está unido por un receptor de antígeno puede inducir preferiblemente, opcionalmente en presencia de señales co-estimuladoras apropiadas, estimulación, cebado y/o expansión de la célula T que porta el receptor de antígeno que se une al antígeno. El reconocimiento de un antígeno en la superficie de una célula enferma puede provocar una reacción inmune contra el antígeno (o la célula que expresa el antígeno).

55 De acuerdo con los diversos aspectos de la enseñanza, el objetivo es preferiblemente proporcionar una respuesta inmune contra las células enfermas que expresan un antígeno como las células cancerígenas que expresan un antígeno, como el antígeno tumoral, en particular CLDN6 o CLDN18.2, y para tratar una enfermedad tal como una enfermedad cancerígena que involucra células que expresan un antígeno tal como un antígeno tumoral. Preferiblemente, la enseñanza implica la administración de células efectoras inmunes diseñadas por el receptor de antígeno, tales como células T dirigidas contra células enfermas que expresan un antígeno. Las células que expresan un antígeno en la superficie pueden ser atacadas por las células efectoras inmunes que llevan un receptor de antígeno dirigido al antígeno.

60

La "superficie celular" se utiliza de acuerdo con su significado normal en la técnica, y por lo tanto incluye el exterior de la célula que está accesible para la unión por proteínas y otras moléculas. Un antígeno se expresa en la superficie de las células si está ubicado en la superficie de dichas células y es accesible para la unión mediante moléculas de unión al antígeno tales como receptores de antígeno o anticuerpos específicos de antígeno añadidos a las células. En una realización, un antígeno expresado en la superficie de las células es una proteína integral de membrana que tiene una porción extracelular reconocida por un receptor de antígeno. Un receptor de antígeno se expresa en la superficie de las células si está ubicado en la superficie de dichas células y es accesible para la unión de, por ejemplo, el antígeno al cual el receptor de antígeno es específico agregado a las células. En una realización, un receptor de antígeno expresado en la superficie de las células es una proteína integral de membrana que tiene una porción extracelular que reconoce a el antígeno.

El término "porción extracelular" o "exodominio" en el contexto de la presente enseñanza se refiere a una parte de una molécula tal como una proteína que se enfrenta al espacio extracelular de una célula y preferiblemente es accesible desde el exterior de dicha célula, por ejemplo, mediante la unión de moléculas tales como anticuerpos ubicados fuera de la célula. Preferiblemente, el término se refiere a uno o más bucles o dominios extracelulares o un fragmento de los mismos.

Los términos "porción" o "parte" se utilizan indistintamente en la presente memoria y se refieren a un elemento continuo o discontinuo de una estructura tal como una secuencia de aminoácidos. El término "fragmento" se refiere a un elemento continuo de una estructura tal como una secuencia de aminoácidos. Una porción, parte o fragmento de una estructura comprende preferiblemente una o más propiedades funcionales, por ejemplo, propiedades antigénicas, inmunológicas y/o de unión, de dicha estructura. Una porción o parte de una secuencia de proteína comprende preferiblemente al menos 6, en particular al menos 8, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 50, o al menos 100 aminoácidos consecutivos y/o no consecutivos de la secuencia de la proteína. Un fragmento de una secuencia de proteína comprende preferiblemente al menos 6, en particular al menos 8, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 50, o al menos 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia de proteínas.

De acuerdo con la enseñanza, un antígeno no se expresa (sustancialmente) en una célula si el nivel de expresión está por debajo del límite de detección y/o si el nivel de expresión es demasiado bajo para permitir la unión por anticuerpos específicos al antígeno añadidos a la célula. De acuerdo con la enseñanza, un antígeno se expresa en una célula si el nivel de expresión está por encima del límite de detección y/o si el nivel de expresión es lo suficientemente alto como para permitir la unión de anticuerpos específicos de antígeno añadidos a la célula. Preferiblemente, un antígeno expresado en una célula se expresa o expone, es decir, está presente en la superficie de dicha célula y, por lo tanto, está disponible para la unión por moléculas específicas de antígeno tales como anticuerpos o receptores de antígeno añadidos a la célula.

"Célula diana" va a significar una célula que es una diana para una respuesta inmune tal como una respuesta inmune celular. Las células diana incluyen a cualquier célula indeseable, como una célula cancerígena. En realizaciones preferidas, la célula diana es una célula que expresa un antígeno diana, en particular un antígeno específico de la enfermedad, que preferiblemente está presente en la superficie celular.

El término "epítotope" se refiere a un determinante antigénico en una molécula tal como un antígeno, es decir, a una parte o fragmento de la molécula que es reconocida, es decir, unida por el sistema inmune, por ejemplo, que es reconocida por un anticuerpo o un receptor de antígeno. Por ejemplo, los epítotos son los sitios tridimensionales discretos en un antígeno, que son reconocidos por el sistema inmune. Los epítotos generalmente consisten en agrupaciones de moléculas químicamente activas en la superficie, como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítotos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de solventes desnaturizantes. Preferiblemente, un epítotope es capaz de provocar una respuesta inmune contra el antígeno o una célula que expresa a el antígeno. Preferiblemente, el término se refiere a una porción inmunogénica de un antígeno. Un epítotope de una proteína tal como un antígeno tumoral comprende preferiblemente una porción continua o discontinua de dicha proteína y está preferiblemente entre 5 y 100, preferiblemente entre 5 y 50, más preferiblemente entre 8 y 30, lo más preferiblemente entre 10 y 25 aminoácidos de longitud, por ejemplo, el epítotope puede tener preferiblemente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud.

El "procesamiento de antígeno" se refiere a la degradación de un antígeno en productos de procesamiento, que son fragmentos de dicho antígeno (por ejemplo, la degradación de una proteína en péptidos) y la asociación de uno o más de estos fragmentos (por ejemplo, mediante unión) con moléculas de CHP para su presentación por células, preferiblemente células presentadoras de antígeno a células T específicas.

Una célula presentadora de antígeno (CPA) es una célula que muestra un antígeno en el contexto del complejo de histocompatibilidad principal (CHP) en su superficie. Las células T pueden reconocer a este complejo utilizando su receptor de células T (RCT). Las células presentadoras de antígeno procesan los antígenos y los presentan a las células T. De acuerdo con la enseñanza, el término "célula presentadora de antígeno" incluye células presentadoras de antígeno profesionales y células presentadoras de antígeno no profesionales.

- Las células presentadoras de antígeno profesionales son muy eficientes para internalizar a el antígeno, ya sea por fagocitosis o por endocitosis mediada por el receptor, y luego muestran un fragmento del antígeno, unido a una molécula de CHP de clase II, en su membrana. La célula T reconoce e interacciona con el complejo de molécula CHP de antígeno de clase II en la membrana de la célula presentadora de antígeno. Luego, la célula presentadora de antígeno produce una señal co-estimuladora adicional, que conduce a la activación de la célula T. La expresión de las moléculas co-estimuladoras es una característica definitoria de las células presentadoras de antígeno profesionales. Los principales tipos de células presentadoras de antígeno profesionales son las células dendríticas, que tienen el intervalo más amplio de presentación de antígeno, y son probablemente las células presentadoras de antígeno más importantes, macrófagos, células B y ciertas células epiteliales activadas.
- Las células presentadoras de antígeno no profesionales no expresan constitutivamente a las proteínas CHP de clase II requeridas para la interacción con las células T nativas; estos se expresan solamente después de la estimulación de las células presentadoras de antígeno no profesionales por ciertas citocinas como IFN $\gamma$ .
- Las células dendríticas (CDs) son poblaciones de leucocitos que presentan antígenos capturados en los tejidos periféricos a las células T a través de las vías de presentación de antígeno CHP de clase II y I. Es bien sabido que las células dendríticas son potentes inductores de respuestas inmunes y la activación de estas células es un paso crítico para la inducción de la inmunidad antitumoral. Las células dendríticas y los progenitores pueden obtenerse de sangre periférica, médula ósea, células infiltrantes de tumores, células infiltrantes de tejidos peritumorales, nódulos linfáticos, bazo, piel, sangre de cordón umbilical o cualquier otro tejido o líquido adecuado. Por ejemplo, las células dendríticas pueden diferenciarse *ex vivo* mediante la adición de una combinación de citocinas como GM-CSF, IL-4, IL-13 y/o FNT $\alpha$  a cultivos de monocitos recolectados de sangre periférica. Alternativamente, las células positivas para CD34 recolectadas de sangre periférica, sangre del cordón umbilical o médula ósea pueden diferenciarse en células dendríticas al agregar al medio de cultivo combinaciones de GM-CSF, IL-3, FNT $\alpha$ , ligando CD40, LPS, ligando flt3 y/o otro(s) compuesto(s) que inducen la diferenciación, maduración y proliferación de células dendríticas. Las células dendríticas se clasifican convenientemente como células "inmaduras" y "maduras", que pueden utilizarse como una forma simple de discriminar entre dos fenotipos bien caracterizados. Sin embargo, esta nomenclatura no debe interpretarse para excluir todas las posibles etapas intermedias de diferenciación. Las células dendríticas inmaduras se caracterizan como células presentadoras de antígenos con una alta capacidad de absorción y procesamiento de antígenos, lo que se correlaciona con la alta expresión del receptor de Fc $\gamma$  y el receptor de manosa. El fenotipo maduro se caracteriza típicamente por una menor expresión de estos marcadores, pero una alta expresión de las moléculas de la superficie celular responsables por la activación de las células T, como el CHP de clase I y II, las moléculas de adhesión (por ejemplo, CD54 y CD11) y las moléculas co-estimuladoras (por ejemplo, CD40, CD80, CD86 y 4-1 BB). La maduración de las células dendríticas se conoce como el estado de activación de las células dendríticas en el que dichas células dendríticas presentadoras de antígeno conducen al cebado de las células T, mientras que la presentación por células dendríticas inmaduras resulta en tolerancia. La maduración de las células dendríticas es causada principalmente por biomoléculas con características microbianas detectadas por receptores innatos (ADN bacteriano, ARN viral, endotoxina, etc.), citocinas proinflamatorias (FNT, IL-1, IFN), ligación de CD40 en la superficie de la célula dendrítica por CD40L, y sustancias liberadas de las células que sufren una muerte celular estresante. Las células dendríticas pueden derivarse cultivando células de médula ósea *in vitro* con citocinas, como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-FEC) y el factor alfa de necrosis tumoral.
- El término "inmunogenicidad" se refiere a la eficacia relativa de un antígeno para inducir una reacción inmune.
- El término "funciones efectoras inmunes" en el contexto de la presente enseñanza incluye cualquier función mediada por componentes del sistema inmune que dan como resultado, por ejemplo, la muerte de células enfermas, como las células tumorales, o la inhibición del crecimiento tumoral y/o la inhibición del desarrollo tumoral, incluida la inhibición de la diseminación tumoral y la metástasis. Preferiblemente, las funciones efectoras inmunes en el contexto de la presente enseñanza son funciones efectoras mediadas por células T. Dichas funciones comprenden en el caso de una célula T auxiliar (célula T CD4 $^{+}$ ) la liberación de citocinas como la Interleucina-2 y/o la activación de linfocitos CD8 $^{+}$  (CTL) y/o células B, y en el caso de CTL la eliminación de células, es decir, células caracterizadas por la expresión de un antígeno, por ejemplo, a través de apoptosis o de lisis celular mediada por perforina, producción de citocinas como IFN- $\gamma$  y FNT- $\alpha$ , y muerte citolítica específica de células diana que expresan al antígeno.
- El término "célula inmunorreactiva" o "célula inmune efectora" en el contexto de la presente enseñanza se refiere a una célula que ejerce funciones efectoras durante una reacción inmune. Una "célula inmunorreactiva" preferiblemente es capaz de unirse a un antígeno tal como un antígeno expresado en la superficie de una célula y mediar una respuesta inmune. Por ejemplo, tales células secretan citocinas y/o quimiocinas, matan microbios, secretan anticuerpos, reconocen células infectadas o cancerígenas, y opcionalmente eliminan a tales células. Por ejemplo, las células inmunorreactivas comprenden células T (células T citotóxicas, células T auxiliares, células T infiltrantes de tumores), células B, células asesinas naturales, neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. Preferiblemente, en el contexto de la presente enseñanza, las "células inmunorreactivas" son células T, preferiblemente células T CD4 $^{+}$  y/o CD8 $^{+}$ . De acuerdo con la enseñanza, el término "célula inmunorreactiva" también incluye una célula que puede madurar en una célula inmune (tal como una célula T, en particular una célula T auxiliar o una célula T citolítica) con la estimulación adecuada. Las células inmunorreactivas comprenden células madre hematopoyéticas CD34 $^{+}$ , células T inmaduras y maduras y células B inmaduras y maduras. La diferenciación de precursores de células T en una célula T citolítica, cuando se expone a un antígeno, es similar a la selección clonal del sistema inmune.

Preferentemente, una "célula inmunorreactiva" o una "célula inmune efectora" reconoce a un antígeno con cierto grado de especificidad, en particular si está presente en la superficie de las células presentadoras de antígeno o en células enfermas tales como las células cancerígenas. Preferiblemente, dicho reconocimiento permite que la célula que reconoce un antígeno sea sensible o reactiva. Si la célula es una célula T auxiliar (célula T CD4<sup>+</sup>), tal capacidad de respuesta o reactividad puede implicar la liberación de citocinas y/o la activación de linfocitos CD8<sup>+</sup> (CTL) y/o células B. Si la célula es una CTL, dicha capacidad de respuesta o reactividad puede implicar la eliminación de células, es decir, células caracterizadas por la expresión de un antígeno, por ejemplo, mediante apoptosis o lisis celular mediada por perforina. De acuerdo con las enseñanzas, la capacidad de respuesta de CTL puede incluir el flujo sostenido de calcio, la división celular, la producción de citocinas como IFN- $\gamma$  y FNT- $\alpha$ , la regulación positiva de los marcadores de activación como CD44 y CD69 y la muerte citolítica específica de las células diana que expresan el antígeno. La capacidad de respuesta de CTL también se puede determinar utilizando un indicador artificial que indica con precisión la capacidad de respuesta de CTL. Tales CTL que reconocen un antígeno y son sensibles o reactivas también se denominan en la presente como "CTL sensibles a antígenos".

Una "célula linfoide" es una célula que, opcionalmente después de una modificación adecuada, por ejemplo, después de la transferencia de un receptor de células T o un receptor de antígeno, es capaz de producir una respuesta inmune tal como una respuesta celular inmune, o una célula precursora de dicha célula, e incluye linfocitos, preferiblemente linfocitos T, linfoblastos y células plasmáticas. Una célula linfoide puede ser una célula inmunorreactiva o una célula inmune efectora como se describe en la presente memoria. Una célula linfoide preferida es una célula T que se puede modificar para expresar un receptor de células T o un receptor de antígeno en la superficie celular. En una realización, la célula linfoide carece de la expresión endógena de un receptor de células T.

Los términos "célula T" y "linfocito T" se utilizan indistintamente en la presente memoria e incluyen células T auxiliares (células T CD4<sup>+</sup>) y células T citotóxicas (CTL, células T CD8<sup>+</sup>) que comprenden células T citolíticas.

Las células T pertenecen a un grupo de glóbulos blancos conocidos como linfocitos, y juegan un papel central en la inmunidad celular. Se pueden distinguir de otros tipos de linfocitos, como las células B y las células asesinas naturales por la presencia de un receptor especial en su superficie celular llamado receptor de células T (RCT). El timo es el principal órgano responsable de la maduración de las células T. Se han descubierto varios subconjuntos diferentes de células T, cada uno con una función distinta.

Las células T auxiliares ayudan a otros glóbulos blancos en procesos inmunológicos, incluyendo la maduración de células B en células plasmáticas y la activación de células T citotóxicas y macrófagos, entre otras funciones. Estas células también se conocen como células T CD4<sup>+</sup> porque expresan a la proteína CD4 en su superficie. Las células T auxiliares se activan cuando las moléculas CHP de clase II que se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígeno (CPA) les presentan antígenos peptídicos. Una vez activados, se dividen rápidamente y secretan pequeñas proteínas llamadas citocinas que regulan o asisten en la respuesta inmune activa.

Las células T citotóxicas destruyen las células infectadas por virus y las células tumorales, y también están implicadas en el rechazo de trasplantes. Estas células también se conocen como células T CD8<sup>+</sup> ya que expresan a la glucoproteína CD8 en su superficie. Estas células reconocen a sus blancos al unirse al antígeno asociado con el CHP de clase I, que está presente en la superficie de casi todas las células del cuerpo.

La mayoría de las células T tienen un receptor de células T (RCT) que existe como un complejo de varias proteínas. El receptor de células T real está compuesto por dos cadenas peptídicas separadas, que se producen a partir de los genes alfa y beta (RCT $\alpha$  y RCT $\beta$ ) del receptor de células T independientes y se denominan cadenas de RCT  $\alpha$  y  $\beta$ . Las células T  $\gamma\delta$  (células T gamma delta) representan un pequeño subconjunto de células T que poseen un receptor distinto de células T (RCT) en su superficie. Sin embargo, en las células T  $\gamma\delta$ , el RCT está formado por una cadena  $\gamma$  y una cadena  $\delta$ . Este grupo de células T es mucho menos común (2% del total de células T) que las células T  $\alpha\beta$ .

Todas las células T se originan a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Los progenitores hematopoyéticos derivados de células madre hematopoyéticas van a poblar el timo y se expanden por división celular para generar una gran población de timocitos inmaduros. Los primeros timocitos no expresan ni CD4 ni CD8 y, por lo tanto, se clasifican como células doblemente negativas (CD4-CD8-). A medida que avanzan en su desarrollo, se convierten en timocitos doble positivos (CD4+ CD8+), y finalmente maduran a timocitos positivos únicos (CD4+CD8- o CD4-CD8+) que luego se liberan del timo a los tejidos periféricos.

Las células T generalmente se pueden preparar *in vitro* o *ex vivo*, utilizando procedimientos estándar. Por ejemplo, las células T pueden aislarse de la médula ósea, la sangre periférica o una fracción de la médula ósea o la sangre periférica de un mamífero, como un paciente, utilizando un sistema de separación celular disponible comercialmente. Alternativamente, las células T pueden derivarse de humanos relacionados o no relacionados, animales no humanos, líneas celulares o cultivos. Una muestra que comprende células T puede, por ejemplo, ser células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

Las células T que se utilizarán de acuerdo con la enseñanza pueden expresar un receptor de células T endógenas o pueden carecer de la expresión de un receptor de células T endógenas.

Los ácidos nucleicos tales como el ARN que codifica para un receptor de antígeno pueden introducirse en células T u otras células con potencial lítico, en particular células linfoides.

El término "receptor de antígeno dirigido a un antígeno" o términos similares se refieren a un receptor de antígeno que cuando está presente en una célula inmune efectora tal como una célula T reconoce a el antígeno tal como en la superficie de las células presentadoras de antígeno o células enfermas tales como células cancerígenas, de modo que la célula inmune efectora se estimula, crece y/o expande o ejerce funciones efectoras de las células inmunes efectoras como se describió anteriormente.

El término "célula T específica de antígeno" o términos similares se refieren a una célula T que, en particular cuando se proporciona con un receptor de antígeno, reconoce a el antígeno al que se dirige el receptor de antígeno tal como en la superficie de las células presentadoras de antígeno o células enfermas tales como células cancerígenas y preferiblemente ejerce funciones efectoras de células T como se describió anteriormente. Las células T y otras células linfoides se consideran específicas para el antígeno si las células matan a las células diana que expresan un antígeno. La especificidad de las células T puede evaluarse utilizando cualquiera de una variedad de técnicas estándar, por ejemplo, dentro de un ensayo de liberación de cromo o ensayo de proliferación. Alternativamente, se puede medir la síntesis de linfocinas (como el interferón- $\gamma$ ).

El término "complejo principal de histocompatibilidad" y la abreviatura "CHP" incluyen moléculas de CHP de clase I y CHP de clase II y se refieren a un complejo de genes que se produce en todos los vertebrados. Las proteínas o moléculas de CHP son importantes para la señalización entre linfocitos y células presentadoras de antígeno o células enfermas en reacciones inmunes, en el que las proteínas o moléculas de CHP se unen a péptidos y los presentan para su reconocimiento por los receptores de células T. Las proteínas codificadas por el CHP se expresan en la superficie de las células y muestran tanto antígenos propios (fragmentos peptídicos de la propia célula) como antígenos no propios (por ejemplo, fragmentos de microorganismos invasores) a una célula T.

De acuerdo con la enseñanza, el término "receptor de antígeno" incluye receptores diseñados, que confieren una especificidad arbitraria tal como la especificidad de un anticuerpo monoclonal sobre una célula efectora inmune tal como una célula T. De esta manera, se puede generar una gran cantidad de células T específicas de antígeno para la transferencia de células adoptivas. Por lo tanto, un receptor de antígeno de acuerdo con la enseñanza puede estar presente en las células T, por ejemplo, en lugar de o además del propio receptor de células T de la célula T. Dichas células T no requieren necesariamente el procesamiento y la presentación de un antígeno para el reconocimiento de la célula diana, sino que pueden reconocer preferiblemente con especificidad a cualquier antígeno presente en una célula diana. Preferiblemente, dicho receptor de antígeno se expresa en la superficie de las células. Para el propósito de la presente enseñanza, las células T que comprenden un receptor de antígeno están comprendidas por el término "célula T" como se utiliza en la presente memoria. Específicamente, de acuerdo con la enseñanza, el término "receptor de antígeno" incluye receptores artificiales que comprenden una sola molécula o un complejo de moléculas que reconocen, es decir, se unen a una estructura diana (por ejemplo, un antígeno) en una célula diana tal como una célula cancerígena (por ejemplo, mediante la unión de un sitio de unión al antígeno o dominio de unión al antígeno a un antígeno expresado en la superficie de la célula diana) y puede conferir especificidad a una célula efectora inmune tal como una célula T que expresa dicho receptor de antígeno en la superficie celular. Preferiblemente, el reconocimiento de la estructura diana por un receptor de antígeno resulta en la activación de una célula efectora inmune que expresa a dicho receptor de antígeno. Un receptor de antígeno puede comprender una o más unidades de proteína, dichas unidades de proteína que comprenden uno o más dominios como se describe en el presente documento. El término "receptor de antígeno" preferiblemente no incluye receptores de células T. De acuerdo con la enseñanza, el término "receptor de antígeno" es preferiblemente sinónimo de los términos "receptor de antígeno quimérico (RAQ)", "receptor de células T quimérico" y "receptor de células T artificial".

De acuerdo con la enseñanza, un receptor de antígeno puede reconocer al antígeno a través de cualquier dominio de reconocimiento de antígeno (en la presente memoria también denominado simplemente "dominio") es capaz de formar un sitio de unión al antígeno a través de porciones de anticuerpos y receptores de células T que se unen a los receptores de antígeno celulares que pueden residir en la misma o en diferentes cadenas peptídicas. En una realización, los dos dominios que forman un sitio de unión al antígeno se derivan de una inmunoglobulina. En otra realización, los dos dominios que forman un sitio de unión al antígeno se derivan de un receptor de células T. Particularmente preferidos son los dominios variables de anticuerpos, tales como fragmentos variables de cadena sencilla (Fvcs) derivados de anticuerpos monoclonales y dominios variables de receptores de células T, en particular cadenas sencillas alfa y beta de RCT. De hecho, casi cualquier cosa que se una a una diana establecida con alta afinidad puede utilizarse como un dominio de reconocimiento de antígeno.

En una realización, un receptor de antígeno de la enseñanza comprende al menos cuatro dominios variables de inmunoglobulina que forman al menos dos sitios de unión, en los que los dos sitios de unión pueden unirse al mismo o a diferentes epítopes, cuyos epítopes pueden estar ubicados en el mismo o diferentes antígenos. En una realización, el receptor de antígeno comprende un dominio variable (o región) de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VP) con una especificidad para un primer epítope (VP(1)), un dominio variable (o región) de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con una especificidad para un primer epítope (VL(1)), un dominio variable (o región) de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VP) con una especificidad para un segundo epítope (VP(2)), y un dominio variable (o región) de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con una especificidad para un segundo epítope

(VL(2)), cuyo primer y segundo epítopes pueden ser iguales o diferentes y pueden estar ubicados en el mismo o en diferentes antígenos. En una realización, VP(1) puede interaccionar y formar un sitio de unión al antígeno con VL(1) y VP(2) puede interaccionar y formar un sitio de unión al antígeno con VL(2), mientras que VP(1) no puede interaccionar y formar un sitio de unión al antígeno con VL(2) y VP(2) no puede interaccionar y formar un sitio de unión al antígeno con VL(1). Sin embargo, en otra realización, VP(1) puede interaccionar y formar un sitio de unión al antígeno con VL(1) así como VL(2) y VP(2) puede interaccionar y formar un sitio de unión al antígeno con VL(2) así como VL(1). En la última realización, VP(1) y VP(2) pueden ser idénticos o al menos derivados de la misma inmunoglobulina y VL(1) y VL(2) pueden ser idénticos o al menos derivados de la misma inmunoglobulina.

En un aspecto, la enseñanza se refiere a un receptor de antígeno, también denominado receptor de antígeno combinatorio en el presente documento, cuyo receptor comprende una primera cadena peptídica y una segunda cadena peptídica, en el que la primera cadena peptídica comprende al menos un primer y un segundo dominio, y un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora; la segunda cadena peptídica comprende al menos un primer y un segundo dominio, y un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora; en el que el primer dominio de la primera cadena peptídica se forma junto con uno de los dominios de la segunda cadena peptídica un primer sitio de unión al antígeno, y en donde el segundo dominio de la primera cadena peptídica se forma junto con el otro dominio de la segunda cadena peptídica un segundo sitio de unión al antígeno.

En una realización, el receptor de antígeno combinatorio de la enseñanza comprende un dominio variable de la cadena pesada conectado a un dominio variable de la cadena ligera en cada una de las dos cadenas peptídicas en donde la formación de dos sitios de unión al antígeno tiene lugar a través de la interacción entre un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera en diferentes cadenas peptídicas. En una realización, el receptor de antígeno combinatorio de la enseñanza comprende dos cadenas peptídicas, en el que una cadena peptídica comprende VL(1) y VP(2) y la otra cadena polipeptídica comprende VP(1) y VL(2). En otra realización, el receptor de antígeno combinatorio de la enseñanza comprende un dominio variable de cadena pesada conectado a un dominio variable de cadena pesada en una cadena peptídica y un dominio variable de la cadena ligera conectado a un dominio variable de la cadena ligera en la otra cadena peptídica en la que se forman de dos sitios de unión al antígeno tiene lugar a través de la interacción entre un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera en diferentes cadenas peptídicas. En una realización, el receptor de antígeno combinatorio de la enseñanza comprende dos cadenas peptídicas, en donde una cadena peptídica comprende VP(1) y VP(2) y la otra cadena peptídica comprende VL(1) y VL(2).

En una realización, el receptor de antígeno combinatorio de la enseñanza comprende una primera cadena peptídica en la que la región variable de la cadena pesada (VH) y la región variable de la cadena ligera (VL) están preferiblemente dispuestas, desde el extremo N-terminal al C-terminal, en el orden VP(1)-VL (2) y una segunda cadena peptídica en la que la región variable de la cadena pesada (VP) y la región variable de la cadena ligera (VL) están preferiblemente dispuestas, desde el extremo N-terminal al C-terminal, en el orden VL(1)-VP(2). El dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora se ubica preferiblemente en el C-terminal a la disposición de regiones variables y preferiblemente comprende una región constante de una cadena alfa del receptor de células T o una porción de la misma ubicada en una de las cadenas peptídicas y una región constante de un receptor de células T cadena beta ubicada en la otra de las cadenas peptídicas.

En un aspecto, la enseñanza se refiere a un receptor de antígeno, también denominado receptor de antígeno en tándem en la presente memoria, cuyo receptor comprende una primera cadena peptídica y una segunda cadena peptídica, en el que la primera cadena peptídica comprende al menos cuatro dominios y dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora; la segunda cadena peptídica comprende un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora; en el que dos de los dominios de la primera cadena peptídica forman un primer sitio de unión al antígeno, y en el que los otros dos dominios de la primera cadena peptídica forman un segundo sitio de unión al antígeno.

En una realización, el receptor de antígeno en tándem de la enseñanza comprende un dominio variable de la cadena pesada conectado a un dominio variable de la cadena ligera conectado a un dominio variable de la cadena pesada adicional conectado a un dominio variable de la cadena ligera en la primera cadena peptídica en la que se forma dos sitios de unión al antígeno tienen lugar a través de la interacción entre un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera en la misma cadena peptídica. Por lo tanto, la primera cadena peptídica comprende VP(1) y VL(1), así como VP(2) y VL(2) en la misma cadena peptídica. En una realización, se puede considerar que el receptor de antígeno en tándem de la enseñanza comprende dos moléculas Fvcs conectadas a través de un péptido enlazador en la primera cadena peptídica.

En una realización, el receptor de antígeno en tándem de la enseñanza comprende una primera cadena peptídica en la que la región variable de cadena pesada (VH) y la región variable de cadena ligera (VL) están preferiblemente dispuestas, desde el extremo N al terminal C, en el orden VP(1) -VL(1) -VP(2) -VL(2), VL(1) -VP(1) -VP(2) -VL(2), VP(1) -VL(1) -VL(2) -VP(2) o VL(1) -VP(1) -VL(2) -VP(2). El dominio de transmisión de la señal del inmunoreceptor se ubica preferiblemente en el extremo C-terminal del arreglo de regiones variables y preferiblemente comprende una región constante de una cadena alfa del receptor de células T o una porción de la misma o una región constante de una cadena beta del receptor de células T o una porción en esto. El dominio de transmisión de señal del inmunoreceptor ubicado en la segunda cadena peptídica comprende preferiblemente una región constante de una

cadena alfa del receptor de células T o una porción de la misma si la primera cadena peptídica comprende una región constante de una cadena beta del receptor de células T o una porción de la misma o una constante región de una cadena beta del receptor de células T o una porción de la misma si la primera cadena peptídica comprende una región constante de una cadena alfa del receptor de células T o una porción de la misma.

5 Los receptores de antígeno de la enseñanza tienen al menos dos sitios de unión al antígeno y, por lo tanto, son al menos bivalentes. Como se señaló anteriormente, los sitios de unión de los receptores de antígeno de la enseñanza pueden unirse al mismo o a diferentes epítopes, epítopes que pueden localizarse en el mismo o en diferentes antígenos. Si los sitios de unión se unen a los mismos epítopes, en particular en el mismo antígeno, los dos sitios de unión pueden ser idénticos o esencialmente idénticos y/o pueden estar formados por dominios idénticos o esencialmente idénticos, en el que dichos dominios idénticos o esencialmente idénticos pueden derivarse, por ejemplo, de la misma inmunoglobulina. Si los sitios de unión se unen a diferentes epítopes, ya sea en el mismo antígeno o en uno diferente, los dos sitios de unión son diferentes y están formados por diferentes dominios, en el que dichos diferentes dominios pueden derivarse de diferentes inmunoglobulinas. En el caso de tales dominios diferentes, se prefiere que los dominios que tienen diferentes especificidades de epítipo no interactúen o no interactúen sustancialmente entre sí, es decir, VP(1) no puede interactuar y formar un sitio de unión al antígeno con VL(2) y VP(2) no puede interactuar y formar un sitio de unión al antígeno con VL(1). En consecuencia, VP(1) interactúa y forma un sitio de unión al antígeno con VL(1) y VP(2) interactúa y forma un sitio de unión al antígeno con VL(2). Si un receptor de antígeno combinatorio de la enseñanza comprende dos cadenas peptídicas, en donde una cadena peptídica comprende VP(1) y VL(2) y la otra cadena peptídica comprende VP(2) y VL(1), esto resultada en que las cadenas peptídicas no pueden formar sitios de unión al antígeno a través de la interacción intramolecular de dominios.

Los dos dominios de un receptor de antígeno de la enseñanza que forman un sitio de unión al antígeno también pueden derivarse de un receptor de células T y pueden ser fragmentos o porciones del mismo que mantienen la unión específica del antígeno, en particular la unión al complejo péptido-CHP, como las regiones variables de un receptor de células T.

25 De acuerdo con la enseñanza, el término "región variable de un receptor de células T" se refiere a los dominios variables de las cadenas de RCT. La región variable de la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  de RCT tiene tres regiones determinantes de hipervariabilidad o complementariedad (RDCs), mientras que la región variable de la cadena  $\beta$  tiene un área adicional de hipervariabilidad (HV4) que normalmente no contacta con el antígeno y por lo tanto no se considera un RDC. RDC3 es el principal RDC responsable por el reconocimiento del antígeno procesado, aunque también se ha demostrado que RDC1 de la cadena  $\alpha$  interactúa con la parte N-terminal del péptido antigénico, mientras que RDC1 de la cadena  $\beta$  interactúa con la parte C-terminal del péptido. Se cree que RDC2 reconoce al CHP. No se cree que RDC4 de la cadena  $\beta$  participe en el reconocimiento de antígenos, pero se ha demostrado que interactúa con superantígenos.

35 La divulgación anterior relacionada con los dominios variables de la inmunoglobulina se aplica de forma correspondiente a los dominios variables del receptor de células T, un receptor de antígeno de la enseñanza en lugar de un dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VP) con una especificidad para un primer epítipo (VP(1)) y un dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con una especificidad para un primer epítipo (VL(1)) puede comprender un dominio variable de una cadena  $\alpha$  de RCT de un RCT con una especificidad para un primer epítipo y un dominio variable de una cadena  $\beta$  de RCT de un RCT con una especificidad para un primer epítipo. Alternativa o adicionalmente, un receptor de antígeno de la enseñanza en lugar de un dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VP) con una especificidad para un segundo epítipo (VP(2)), y un dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con una especificidad para un segundo epítipo (VL(2)) puede comprender un dominio variable de una cadena  $\alpha$  de RCT de un RCT con una especificidad para un segundo epítipo y un dominio variable de una cadena  $\beta$  de RCT de un RCT con una especificidad para un segundo epítipo.

45 Dado que cada sitio de unión al antígeno se forma a partir de dos dominios, cada dominio puede comprender una porción o un fragmento de un receptor de inmunoglobulina o de células T, respectivamente. Es posible que la porción o fragmento individual por sí solo no pueda unirse al antígeno, pero cuando las dos porciones o fragmentos individuales se asocian, forman o recrean la estructura de unión al antígeno de la inmunoglobulina original o el receptor de células T y, por lo tanto, son capaces de unirse al mismo antígeno, preferiblemente con la misma afinidad.

50 Después del reconocimiento del antígeno, los receptores se agrupan preferiblemente y se transmite una señal a la célula. A este respecto, un "dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora" o "dominio de señalización de células T" es un dominio que está implicado en transmitir una señal de activación a la célula T después de que se une el antígeno. Tal transmisión de señal puede ser habilitada por los receptores de antígeno de la enseñanza que comprenden una región constante o invariable de una cadena de receptor de células T o una región constante o invariable de una cadena de receptor de Fc de células inmunes o una porción de la región constante o invariable, tal como una región constante de una cadena alfa del receptor de células T o una porción de la misma, en una cadena peptídica y que comprende la región constante o invariable correspondiente de una cadena del receptor de células T o la región constante o invariable correspondiente de una cadena del receptor Fc de células inmunes o una porción de la región constante o invariable, tal como una región constante de una cadena beta del receptor de células T o una porción de la misma, en la otra cadena peptídica. A este respecto, el complejo CD3 denota un antígeno que se expresa

en células T humanas maduras, timocitos y un subconjunto de células asesinas naturales como parte del complejo receptor multimolecular de células T (RCT). El correceptor de células T es un complejo proteico y está compuesto por cuatro cadenas distintas. En mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3 $\gamma$ , una cadena CD3 $\delta$  y dos cadenas CD3 $\epsilon$ . Estas cadenas se asocian con el receptor de células T (RCT) y la cadena  $\zeta$  para generar una señal de activación en los linfocitos T. Las moléculas del RCT, la cadena  $\zeta$  y CD3 juntas comprenden el complejo RCT. CD3 es responsable de la transducción de señales del RCT. Según lo descrito por Lin y Weiss, *Journal of Cell Science* 114, 243-244 (2001), la activación del complejo RCT mediante la unión de epítopes de antígeno específicos presentados por CHP da como resultado la fosforilación de los motivos inmunoreceptores de activación basados en tirosina (IABT) por la familia de quinasas Scr, que desencadenan el reclutamiento de quinasas adicionales dando como resultado la activación de células T, incluyendo la liberación de Ca<sup>2+</sup>. La agrupación de CD3 en células T, por ejemplo, por los anticuerpos anti-CD3 inmovilizados, conduce a la activación de las células T de manera similar al compromiso del receptor de las células T, pero independiente de su especificidad típica de clon.

El dominio de transmisión de señal del receptor de antígeno preferiblemente como mínimo sirve para interactuar con el complejo de transducción de señal celular nativo, por ejemplo, el complejo CD3, que es responsable de transmitir la señal de unión del antígeno a un receptor de antígeno en la célula, dando como resultado activación de las células inmunes. La identidad del dominio de transmisión de señal está limitada solo porque tiene la capacidad de interactuar con el complejo de transducción de señal nativo para inducir la activación de la célula inmune tras la unión del antígeno al receptor de antígeno.

El dominio de transmisión de señal del receptor del antígeno preferiblemente como mínimo sirve para interactuar con el complejo de transducción de señal celular nativo, por ejemplo, el complejo CD3, que es el responsable de transmitir la señal de unión del antígeno a un receptor de antígeno en la célula, dando como resultado la activación de las células inmunes. La identidad del dominio de transmisión de señal está limitada solamente porque tiene la capacidad de interactuar con el complejo de transducción de señal nativo para inducir la activación de la célula inmune tras la unión del antígeno al receptor de antígeno.

Preferentemente, el dominio de transmisión de señal en una cadena peptídica formará un dímero con el dominio de transmisión de señal en la segunda cadena, por ejemplo, a través de puentes disulfuro. Los dominios de transmisión de señal preferidos pueden comprender una región constante o invariable de una cadena del receptor de células T o una región constante o invariable de una cadena del receptor de Fc de células inmunes o una porción de la región constante o invariable. Los dominios de transmisión de señal preferidos pueden comprender la región constante de las cadenas alfa, beta, gamma o delta de un receptor de células T o una porción del mismo, así como las regiones invariables D2 o D3 del dominio constante de un receptor Fc de una célula inmune o una porción del mismo. En una realización preferida, la primera cadena peptídica comprende una región constante de una cadena alfa del receptor de células T o una porción de la misma y la segunda cadena peptídica comprende una región constante de una cadena beta del receptor de células T o una porción de la misma, o la primera cadena peptídica comprende una región constante de una cadena beta del receptor de células T o una porción de la misma y la segunda cadena peptídica comprende una región constante de una cadena alfa del receptor de células T o una porción de la misma. En otra realización, la primera cadena peptídica comprende una región constante de una cadena gamma del receptor de células T o una porción de la misma y la segunda cadena peptídica comprende una región constante de una cadena delta del receptor de células T o una porción de la misma, o la primera cadena peptídica comprende una región constante de una cadena delta del receptor de células T o una porción de la misma y la segunda cadena peptídica comprende una región constante de una cadena gamma del receptor de células T o una porción de la misma. Opcionalmente, los dominios de transmisión de señal pueden modificarse de modo que se crean enlaces disulfuro adicionales entre las cadenas, lo que ocasiona una formación de dímero más efectiva y a una mayor estabilidad del dímero.

Aunque no se quiere limitar a un mecanismo de acción particular, se cree que las dos cadenas peptídicas del receptor de antígeno de la enseñanza, cuando se expresan en la superficie de una célula inmune, forman un dímero debido a interacciones (por ejemplo, enlaces disulfuro) al menos entre los dominios de transmisión de señal del inmunoreceptor individual en las dos cadenas, así como formar un complejo con el complejo endógeno CD3 implicado en la transducción fisiológica de la señal del receptor de células T. Sin embargo, la enseñanza también puede incluir la fusión directa a CD3 $\zeta$  o cualquier otro dominio de señalización de células inmunes (CD3, subunidad CD3 Fc $\gamma$ R) en lugar de dominios RCT C $\alpha$  y C $\beta$ . Tras la unión al antígeno, se cree que se transmite una señal a la célula que conduce a la activación de la célula inmune y a la generación de una respuesta inmune específica al antígeno. Además, se cree que la unión entre cadenas del antígeno proporciona un módulo de transducción de señal de CD3 endógeno-receptor de antígeno-antígeno más estable, cuya mayor estabilidad a su vez permite una estimulación más efectiva de una respuesta inmune específica al antígeno, en comparación con receptores monovalentes y receptores bivalentes solo capaces de unirse al antígeno intra-cadena. También se cree que esta mayor estabilidad permite la opción de utilizar solamente dominios de transmisión de la señal inmunoreceptora de origen humano (por ejemplo, una sustitución mínima o nula de una secuencia de aminoácidos derivada de humanos con una secuencia de aminoácidos derivada de otra especie, como el ratón). Por lo tanto, se puede evitar cualquier respuesta inmune potencial no deseada contra el propio receptor del antígeno.

De acuerdo con la enseñanza, los receptores de antígeno o las cadenas peptídicas de los mismos pueden además de los dominios que forman los sitios de unión al antígeno y los dominios de transmisión de la señal inmunoreceptora

que incluyen CD3 $\zeta$  o cualquier otro dominio de señalización de células inmunes también comprender uno o más dominios de co-estimulación. Los dominios de co-estimulación sirven para mejorar la proliferación y la supervivencia de las células T, como las células T citotóxicas tras la unión del receptor de antígeno a la fracción dirigida. La identidad de los dominios de co-estimulación está limitada solamente en que tienen la capacidad de mejorar la proliferación celular y la supervivencia tras la fracción dirigida por el receptor de antígeno. Los dominios de co-estimulación adecuados incluyen CD28, CD137 (4-1BB), un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (FNT), CD134 (OX40), un miembro de la superfamilia de receptores RFNT-y CD278 (ICOS), una molécula coestimuladora de la superfamilia CD28 expresada en células T activadas. Una persona experta comprenderá que las variantes de secuencia de estos dominios de co-estimulación observados pueden utilizarse sin afectar negativamente a la enseñanza, donde las variantes tienen la misma actividad o actividad similar al dominio en el que se modelaron. Dichas variantes tendrán al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio del que se derivan. En algunas realizaciones de la enseñanza, las construcciones del receptor de antígeno o de las cadenas peptídicas de las mismas comprenden dos dominios de co-estimulación. Mientras las combinaciones particulares incluyen a todas las variaciones posibles de los cuatro dominios señalados, los ejemplos específicos incluyen CD28+ CD137 (4-1BB) y CD28+ CD134 (OX40).

Los receptores de antígeno de la presente enseñanza o las cadenas peptídicas de los mismos pueden comprender uno o más dominios de co-estimulación y dominios de transmisión de la señal inmunoreceptora, unidos en una dirección N-terminal a C-terminal. Sin embargo, los receptores de antígenos de la presente enseñanza o las cadenas peptídicas de los mismos no se limitan a esta disposición y otras disposiciones son aceptables e incluyen dominios de transmisión de la señal inmunoreceptora, y uno o más dominios de co-estimulación.

Se entenderá que debido a que los dominios que forman los sitios de unión al antígeno deben estar libres para unirse al antígeno, la colocación de estos dominios en la proteína de fusión generalmente será tal que se logre la visualización de la región en el exterior de la célula. De la misma manera, debido a que los dominios de co-estimulación y los dominios de transmisión de la señal inmunoreceptora sirven para inducir la actividad y la proliferación de las células T, la proteína de fusión generalmente mostrará estos dominios en el interior de la célula. Los receptores de antígeno pueden incluir elementos adicionales, como un péptido señal para asegurar la exportación adecuada de la proteína de fusión a la superficie celular, un dominio transmembranal para asegurar que la proteína de fusión se mantenga como una proteína integral de membrana y un dominio de bisagra (o región espaciadora) que imparte flexibilidad a los dominios que forman los sitios de unión al antígeno y permite una fuerte unión al antígeno.

Opcionalmente, los receptores de antígeno de la enseñanza pueden comprender además un enlazador, que puede ser una secuencia de aminoácidos arbitraria u otro compuesto químico útil como espaciador entre secuencias de aminoácidos. El enlazador está generalmente diseñado para proporcionar flexibilidad y resistencia a proteasas. Por ejemplo, el enlazador puede estar entre el primer y el segundo dominio en la primera cadena peptídica y/o entre el primer y el segundo dominio en la segunda cadena peptídica de un receptor de antígeno combinatorio de la enseñanza. En otra realización, el enlazador puede estar entre dos cualquiera de los al menos cuatro dominios en la primera cadena peptídica, es decir, entre el primer y segundo dominio y/o entre el segundo y tercer dominio y/o entre el tercer y cuarto dominio de un receptor de antígeno en tándem de la enseñanza. Opcionalmente, el enlazador puede estar presente entre los dominios que forman los sitios de unión al antígeno y el dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora. La enseñanza abarca cualquier tipo de enlazador conocido en la técnica que permita que los dominios formen un sitio de unión al antígeno o que no interfiera con la unión al antígeno. En realizaciones específicas, el enlazador puede ser una secuencia de aminoácidos arbitraria y puede ser de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o al menos 100 residuos de aminoácidos de longitud. Un enlazador de aminoácidos es típicamente rico en glicinas para flexibilidad, así como en serina y treonina para la solubilidad. En una realización, el enlazador es una o más repeticiones (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9) de cuatro residuos de glicina seguidos de un residuo de serina (Gly4Ser). En ciertas realizaciones, el enlazador puede ser una región bisagra de un anticuerpo o un fragmento del mismo.

El receptor de antígeno de la enseñanza puede comprender además otro dominio que ancla al receptor de antígeno en la membrana, tal como un dominio transmembranal clásico. Preferiblemente, el dominio transmembranal está incorporado o es parte del dominio de transmisión de señal.

En otras realizaciones, los receptores de antígeno o las cadenas peptídicas de los receptores de antígeno de la enseñanza pueden comprender además otros dominios, tales como dominios adicionales implicados en o que mejoran la unión al antígeno, secuencias señal para expresión unida a la membrana o para la secreción, dominios que proporcionan una dimerización mejorada, y un dominio transmembranal, cuando no es aún parte del dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora. En ciertas realizaciones, el dominio transmembranal puede ser una hélice alfa hidrofóbica que se extiende a través de la membrana.

Preferentemente, una secuencia señal o péptido señal es una secuencia o péptido que permite el paso suficiente a través de la vía de secreción y la expresión en la superficie celular de manera que un receptor de antígeno, por ejemplo, puede unirse a un antígeno presente en el ambiente extracelular. Preferiblemente, la secuencia señal o péptido señal es escindible y se elimina de las cadenas peptídicas maduras. La secuencia señal o péptido señal se elige preferiblemente con respecto a la célula u organismo en el que se producen las cadenas peptídicas.

En una realización particular, una cadena peptídica de un receptor de antígeno combinatorio de la enseñanza puede comprender la estructura: primer dominio peptídico señal-NH2 implicado en el enlace-antígeno-enlazador-segundo dominio opcional implicado en el antígeno-enlazador-inmunoreceptor de unión opcional dominio de transmisión de señal-COOH.

- 5 En una realización particular, una primera cadena peptídica de un receptor de antígeno en tándem de la enseñanza puede comprender la estructura: primer dominio de péptido señal NH2 implicado en el enlace-antígeno de enlace opcional-segundo dominio implicado en el enlace-enlace de antígeno-enlace opcional tercer dominio implicado en la unión al antígeno-enlazador opcional-cuarto dominio implicado en la unión al antígeno-enlazador opcional-dominio de transmisión de señal del inmunoreceptor-COOH.
- 10 Con respecto a los receptores de antígeno en tándem de la enseñanza, los dominios primero y segundo (del N-terminal al C-terminal) implicados en la formación de un sitio de unión al antígeno de una primera cadena peptídica también se denominan "dominios N-terminales" y los dominios tercero y cuarto (del N-terminal al C-terminal) implicados en la formación de un sitio de unión al antígeno de una primera cadena peptídica también se denominan "dominios C-terminales" en la presente memoria.
- 15 Los ejemplos de receptores de antígeno de la enseñanza incluyen, pero no se limitan a, aquellos formados por las cadenas peptídicas primera y segunda que tienen las estructuras enumeradas a continuación en la Tabla I (VP es la región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina o una porción de la misma; VL es la región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina o una porción de la misma; C1 y C2 son los dominios de transmisión de la señal inmunoreceptora que formarán un dímero entre sí, por ejemplo, la región constante o invariable de una cadena de receptor de Fc de células inmunes, o la región constante o invariable de una cadena de receptores de células T, o una porción de la región constante o invariable):

Tabla I.

Primera cadena peptídica	Segunda cadena peptídica
VP(1)-VL(2)-C1	VL(1)-VP(2)-C2
VP(1)-VP(2)-C1	VL(1)-VL(2)-C2
VP(1)-VP(2)-C1	VL(2)-VL(1)-C2
VP(1)-VL(2)-C1	VP(2)-VL(1)-C2
VP(1)-VL(1)-VP(2)-VL(2)-C1	C2
VL(1)-VP(1)-VP(2)-VL(2)-C1	C2
VP(1)-VL(1)-VL(2)-VP(2)-C1	C2
VL(1)-VP(1)-VL(2)-VP(2)-C1	C2

- 25 Como se definió anteriormente, el receptor de antígeno comprende un dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VP) con una especificidad para un primer epítipo (VP(1)), un dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con una especificidad para un primer epítipo (VL(1)), un dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VP) con una especificidad para un segundo epítipo (VP(2)) y un dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con una especificidad para un segundo epítipo (VL(2)), cuyos primeros y segundos epítopos pueden ser iguales o diferentes y pueden estar ubicados en el mismo o en diferentes antígenos.
- 30 En una realización, VP(1) es capaz de interactuar y formar un sitio de unión al antígeno con VL(1) y VP(2) puede interactuar y formar un sitio de unión al antígeno con VL(2), mientras que VP(1) no es capaz de interactuar y formar un sitio de unión al antígeno con VL(2) y VP(2) no puede interactuar y formar un sitio de unión al antígeno con VL(1). Sin embargo, en otra realización, VP(1) es capaz de interactuar y formar un sitio de unión al antígeno con VL(1) así como VL(2) y VP(2) puede interactuar y formar un sitio de unión al antígeno con VL(2) así como VL(1).
- 35 En la última realización, VP(1) y VP(2) pueden ser idénticos o al menos derivados de la misma inmunoglobulina y VL(1) y VL(2) pueden ser idénticos o al menos derivados de la misma inmunoglobulina.

En realizaciones específicas, los dominios C1 y C2 de las cadenas peptídicas primera y segunda enumeradas en la Tabla 1 son las regiones constantes de las cadenas alfa y beta del receptor de células T, respectivamente, o una porción de las mismas.

- 40 En una realización preferida, cuando los dos dominios en una cadena peptídica son una región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina o una porción de la misma y los dos dominios en la otra cadena son una región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina o una porción de la misma, un enlazador está presente entre el primer y el segundo dominio en ambas cadenas peptídicas. El enlazador puede ser una secuencia de aminoácidos arbitraria entre

10 y 25 aminoácidos de longitud, más preferiblemente 15 aminoácidos de longitud. En una realización específica, el enlazador es 3 repeticiones de la secuencia de aminoácidos de 5-mérica (Gly4Ser).

5 En ciertas realizaciones de la enseñanza, las secuencias de aminoácidos de la primera y segunda cadenas peptídicas, tales como aquellas que comprenden uno o más de los dominios que forman los sitios de unión al antígeno o el dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora, son originarias de mamífero, preferiblemente originarias de ratón, y más preferiblemente originarias de humano. En una realización, las secuencias de aminoácidos son de origen humano, pero han sido murinizadas por la sustitución de uno o más aminoácidos en la secuencia humana con el aminoácido encontrado en la posición correspondiente en la secuencia del ratón. Dicha sustitución puede proporcionar una mayor dimerización o estabilidad o la capacidad para transmitir una señal a la célula tras la unión al antígeno. En otra realización más, las secuencias de aminoácidos son originarias de ratón y se han humanizado.

10 De acuerdo con la enseñanza, un receptor de antígeno puede reemplazar la función de un receptor de células T como se describió anteriormente y, en particular, puede conferir reactividad tal como actividad citolítica a una célula tal como una célula T como se describió anteriormente. Sin embargo, en contraste con la unión del receptor de células T a un complejo antígeno péptido-CHP como se describió anteriormente, un receptor de antígeno puede en ciertas realizaciones unirse a un antígeno, en particular cuando se expresa en la superficie celular.

15 Las secuencias de aminoácidos de las cadenas peptídicas, que incluyen a cualquiera de los dominios o enlazadores, pueden modificarse. Por ejemplo, y como aprecian los expertos en la materia, las secuencias de las regiones variables de anticuerpos y receptores de células T pueden modificarse sin perder la capacidad de unirse a una diana y, en consecuencia, la secuencia de aminoácidos de los sitios de unión al antígeno puede ser modificada de manera similar sin perder la capacidad de unirse a una diana. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de un dominio que forma un sitio de unión al antígeno puede ser idéntica o altamente homóloga a la región variable del anticuerpo del que se deriva. Por "altamente homóloga" se contempla que se puedan hacer de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, tales como 1 a 3 o 1 o 2 sustituciones. En una realización, una cadena peptídica puede incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En otra realización, una cadena peptídica simplemente incluye aminoácidos naturales. El término "aminoácido no natural" se refiere a un aminoácido que tiene una estructura diferente a la de las 20 especies de aminoácidos naturales. Como los aminoácidos no naturales tienen estructuras similares a las de los aminoácidos naturales, los aminoácidos no naturales pueden clasificarse como derivados o análogos de los aminoácidos naturales dados.

20 La presente enseñanza también abarca derivados de los receptores de antígeno y las cadenas peptídicas descritas en la presente. De acuerdo con la enseñanza, los "derivados" son formas modificadas de proteínas y péptidos. Dichas modificaciones incluyen cualquier modificación química y comprenden sustituciones, deleciones y/o adiciones simples o múltiples de cualquier molécula asociada con el receptor de antígeno o la cadena peptídica, como carbohidratos, lípidos y/o proteínas o péptidos. En una realización, los "derivados" de proteínas o péptidos incluyen aquellos análogos modificados que resultan de la glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, palmitoilación, miristoilación, isoprenilación, lipidación, alquilación, derivación, introducción de grupos protectores/bloqueantes, escisión o unión proteolítica a un antígeno. El término "derivado" también se extiende a todos los equivalentes químicos funcionales de dichos receptores de antígeno y cadenas peptídicas. Preferiblemente, un receptor de antígeno modificado o una cadena peptídica del mismo tiene una mayor capacidad de unión o dimerización y/o una mayor capacidad de activación inmunológica.

30 Las células utilizadas en conexión con el sistema receptor de antígeno de la presente enseñanza son preferiblemente células T, en particular linfocitos citotóxicos, seleccionados preferiblemente de células T citotóxicas, células asesinas naturales (AN) y células asesinas activadas por linfocinas (AAL). Tras la activación, cada uno de estos linfocitos citotóxicos desencadena la destrucción de las células diana. Por ejemplo, las células T citotóxicas desencadenan la destrucción de las células diana por uno o ambos de los siguientes medios. Primero, tras la activación, las células T liberan citotoxinas como la perforina, las granzimas y la granulisina.

35 La perforina y la granulisina crean poros en la célula diana, y las granzimas entran en la célula y desencadenan una cascada de caspasas en el citoplasma que induce la apoptosis (muerte celular programada) de la célula. En segundo lugar, la apoptosis puede inducirse mediante la interacción del ligando Fas-Fas entre las células T y las células diana. Los linfocitos citotóxicos serán preferiblemente células autólogas, aunque pueden utilizarse células heterólogas o células alogénicas.

40 El término "inmunoglobulina" se refiere a proteínas de la superfamilia de inmunoglobulinas, preferiblemente a receptores de antígeno tales como anticuerpos o el receptor de células B (RCB). Las inmunoglobulinas se caracterizan por un dominio estructural, es decir, el dominio de inmunoglobulina, que tiene un pliegue característico de inmunoglobulina (Ig). El término abarca a las inmunoglobulinas unidas a la membrana, así como a las inmunoglobulinas solubles. Las inmunoglobulinas unidas a la membrana también se denominan inmunoglobulinas de superficie o inmunoglobulinas de membrana, que generalmente son parte de los RCB. Las inmunoglobulinas solubles se denominan generalmente anticuerpos. Las inmunoglobulinas generalmente comprenden varias cadenas, típicamente dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas que están unidas mediante enlaces disulfuro. Estas cadenas se componen principalmente de dominios de inmunoglobulina, como el dominio V<sub>L</sub> (cadena ligera variable), el dominio C<sub>L</sub> (cadena ligera constante) y los dominios C<sub>P</sub> (cadena pesada constante) C<sub>P1</sub>, C<sub>P2</sub>, C<sub>P3</sub>

y C<sub>P</sub>4. Hay cinco tipos de cadenas pesadas de inmunoglobulina de mamífero, es decir,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , y  $\mu$  que representan las diferentes clases de anticuerpos, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. A diferencia de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas solubles, las cadenas pesadas de inmunoglobulinas de membrana o de superficie comprenden un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático corto en su carboxilo terminal. En los mamíferos hay dos tipos de cadenas ligeras, es decir,  $\lambda$  y  $\kappa$ . Las cadenas de inmunoglobulina comprenden una región variable y una región constante. La región constante se conserva esencialmente dentro de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas, en donde la parte variable es altamente diversa y explica el reconocimiento del antígeno.

El término "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (P) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos quiméricos. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente memoria como VP) y una región constante de la cadena pesada. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente memoria como VL) y una región constante de la cadena ligera. Las regiones VP y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (RDC), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (RM). Cada VP y VL está compuesto por tres RDC y cuatro RM, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: RM1, RDC1, RM 2, RDC2, RM 3, RDC3, RM 4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluidas varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en la presente memoria se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Un anticuerpo monoclonal muestra una especificidad y afinidad de unión única. En una realización, los anticuerpos monoclonales son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano, por ejemplo, un ratón, fusionado a una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo recombinante", como se utiliza en el presente documento, incluye a todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico con respecto a los genes de inmunoglobulina o un hibridoma preparado a partir del mismo, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos combinatorios recombinantes, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

El término "anticuerpo humano", como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del *sitio in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión al antígeno que se deriva sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, en la que la estructura de la inmunoglobulina restante de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión al antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados en dominios constantes o solo las regiones determinantes de complementariedad (RDC) injertadas en regiones marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión al antígeno pueden ser de tipo silvestre o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificado para parecerse más a las inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de RDC (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis RDC del anticuerpo de ratón). Otras formas tienen una o más RDC que están alteradas con respecto al anticuerpo original.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a aquellos anticuerpos en los que una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras es homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenecen a una clase particular, mientras el segmento remanente de la cadena es homólogo a las secuencias correspondientes en otro. Típicamente, la región variable de las cadenas ligeras y pesadas imita a las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos derivados de otra. Una clara ventaja de tales formas quiméricas es que la región variable puede derivarse convenientemente de fuentes actualmente conocidas utilizando células B o hibridomas fácilmente disponibles de organismos huéspedes no humanos en combinación con regiones constantes derivadas, por ejemplo, de preparaciones de células humanas. Mientras que la región variable tiene la ventaja de la facilidad de preparación y la fuente no afecta la especificidad, la región constante siendo humana, es menos probable que provoque una respuesta inmune de un sujeto humano cuando se inyecten los anticuerpos que la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no se limita a este ejemplo en particular.

Los anticuerpos pueden derivarse de diferentes especies, que incluyen, pero no se limitan a ratón, rata, conejo, conejillo de indias y humano.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria incluyen IgA, anticuerpos tales como IgA1 o IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM e IgD. En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, más particularmente un IgG1, kappa o IgG1, isotipo lambda, (es decir, IgG1,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), un anticuerpo IgG2a (por ejemplo, IgG2a,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), un anticuerpo IgG2b (por ejemplo, IgG2b,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), un anticuerpo IgG3 (por ejemplo, IgG3,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ) o un anticuerpo IgG4 (por ejemplo, IgG4,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ).

Los receptores de antígeno descritos en la presente memoria pueden comprender porciones de unión al antígeno de uno o más anticuerpos. Los términos "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de unión") o "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "fragmento de unión") o términos similares se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en los dominios VL, VP, CL y CH; (ii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que consisten en los dominios VP y CH; (iv) fragmentos Fv que consisten en los dominios VL y VP de un solo brazo de un anticuerpo, (v) fragmentos dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consisten en un dominio VP; (vi) regiones determinantes de complementariedad (RDC) aisladas y (vii) combinaciones de dos o más RDC aisladas que pueden unirse opcionalmente por un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VP, están codificados por genes separados, pueden unirse, mediante métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite formarse como una cadena de proteínas única en la que el VL y las regiones VP se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (Fvcs); ver, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también están destinados a estar incluidos en el término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo. Otro ejemplo son las proteínas de fusión de la inmunoglobulina con dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión que está fusionado con un polipéptido de la región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH<sub>2</sub> de la cadena pesada de la inmunoglobulina fusionada con la región bisagra, y (iii) una región constante CH<sub>3</sub> de la inmunoglobulina de cadena pesada fusionada a la región constante de CH<sub>2</sub>. El polipéptido del dominio de unión puede ser una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina con dominio de unión se describen adicionalmente en US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan para su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Un fragmento variable de cadena sencilla (Fvcs) es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesadas (VP) y ligeras (VL) de las inmunoglobulinas, conectadas con un péptido enlazador. El enlazador puede conectar el N-terminal de la VP con el C-terminal de la VL o viceversa. Los fragmentos variables divalentes (o bivalentes) de cadena sencilla (di-Fvcs, bi-Fvcs) se pueden diseñar uniendo dos Fvcs. Esto se puede lograr produciendo una sola cadena peptídica con dos regiones VP y dos regiones VL, produciendo Fvcs en tándem.

El término "dominio de unión" o simplemente "dominio" se caracteriza en relación con la presente enseñanza de una estructura, por ejemplo, de un anticuerpo, que se une/interacciona con una estructura/antígeno/epitope diana dado, opcionalmente cuando interacciona con otro dominio. Por lo tanto, estos dominios de acuerdo con la enseñanza designan un "sitio de unión al antígeno".

Los anticuerpos y los derivados de anticuerpos son útiles para proporcionar dominios de unión tales como fragmentos de anticuerpos, en particular para proporcionar regiones VL y VP.

Los dominios de unión para un antígeno que pueden estar presentes dentro de un receptor de antígeno tienen la capacidad de unirse a (dirigirse a) un antígeno, es decir, la capacidad de unirse a (dirigirse a) un epitope presente en un antígeno, preferiblemente un epitope ubicado dentro del dominio extracelular de un antígeno. Preferiblemente, los dominios de unión para un antígeno son específicos para el antígeno. Preferiblemente, los dominios de unión para un antígeno se unen al antígeno expresado en la superficie celular. En realizaciones preferidas particulares, los dominios de unión para un antígeno se unen a epitopes nativos de un antígeno presente en la superficie de las células vivas.

Todos los anticuerpos y derivados de anticuerpos tales como fragmentos de anticuerpos como se describen en la presente memoria para los fines de la enseñanza están abarcados por el término "anticuerpo".

Los anticuerpos se pueden producir mediante una variedad de técnicas, incluyendo la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975). Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B o técnicas de presentación de fagos utilizando bibliotecas de genes de anticuerpos.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión son conocidos en la técnica. También se conocen los compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión.

- 5 Otros sistemas animales preferidos para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales son el sistema de rata y de conejo (por ejemplo, descrito en Spieker-Polet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9348 (1995), véase también Rossi et al., Am. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005)).

10 Para generar anticuerpos, los ratones pueden inmunizarse con péptidos conjugados en un portador derivados de la secuencia de antígeno, es decir, la secuencia contra la cual deben dirigirse los anticuerpos, una preparación enriquecida de antígeno expresado recombinantemente o fragmentos de los mismos y/o células que expresan el antígeno, como se describió. Alternativamente, los ratones pueden inmunizarse con ADN que codifica para el antígeno o fragmentos del mismo. En el caso de que las inmunizaciones que utilizan una preparación purificada o enriquecida del antígeno no produzcan anticuerpos, los ratones también pueden inmunizarse con células que expresan a el antígeno, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunes.

15 La respuesta inmune se puede monitorear en el transcurso del protocolo de inmunización con muestras de plasma y suero obtenidas por venas de la cola o hemorragias retroorbitales. Los ratones con titulación suficiente de inmunoglobulina pueden utilizarse para fusiones. Los ratones pueden aumentarse por vía intraperitoneal o intravenosa con células que expresan al antígeno 3 días antes de ser sacrificados y la extracción del bazo para aumentar la tasa de hibridomas secretores de anticuerpos específicos.

20 Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales, los esplenocitos y las células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados pueden aislarse y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Las hibridomas resultantes pueden seleccionarse para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Los pozos individuales pueden seleccionarse luego mediante ELISA para detectar hibridomas secretoras de anticuerpos. Mediante análisis de inmunofluorescencia y FACS utilizando células que expresan antígeno, se pueden identificar anticuerpos con especificidad para el antígeno. Las hibridomas secretoras de anticuerpos pueden ser reemplazadas, examinadas nuevamente, y si aún son positivos para anticuerpos monoclonales pueden subclonarse mediante dilución limitante. Los subclones estables se pueden cultivar *in vitro* para generar anticuerpos en medio de cultivo de tejidos para su caracterización.

30 La capacidad de los anticuerpos y otros agentes de unión para unirse a un antígeno se puede determinar utilizando ensayos de unión estándar (por ejemplo, ELISA, Western Blot, inmunofluorescencia y análisis de citometría de flujo).

El término "unión" de acuerdo con la enseñanza se refiere preferiblemente a una unión específica.

35 De acuerdo con la presente enseñanza, un agente tal como un receptor de antígeno es capaz de unirse a (dirigirse a) una diana predeterminada si tiene una afinidad significativa por dicha diana predeterminada y se une a diana predeterminada en ensayos estándar. La "afinidad" o "afinidad de unión" a menudo se mide por la constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ). Preferiblemente, el término "afinidad significativa" se refiere a la unión a un objetivo predeterminado con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-5}$  M o menor,  $10^{-6}$  M o menor,  $10^{-7}$  M o menor,  $10^{-8}$  M o menor,  $10^{-9}$  M o menor,  $10^{-10}$  M o menor,  $10^{-11}$  M o menor, o  $10^{-12}$  M o menor.

40 Un agente no es (sustancialmente) capaz de unirse a (dirigirse a) una diana si no tiene una afinidad significativa por dicha diana y no se une significativamente, en particular no se une de forma detectable, a dicha diana en ensayos estándar. Preferiblemente, el agente no se une de manera detectable a dicha diana si está presente en una concentración de hasta 2, preferiblemente 10, más preferiblemente 20, en particular 50 o 100  $\mu\text{g/ml}$  o más alta. Preferiblemente, un agente no tiene una afinidad significativa por una diana si se une a dicha diana con un  $K_D$  que es al menos 10 veces, 100 veces,  $10^3$  veces,  $10^4$  veces,  $10^5$  veces o  $10^6$  veces mayor que el  $K_D$  para unirse a la diana predeterminada a la que el agente es capaz de unirse. Por ejemplo, si la  $K_D$  para la unión de un agente a la diana a al que el agente es capaz de unirse es  $10^{-7}$  M, la  $K_D$  para la unión a un objetivo para el cual el agente no tiene una afinidad significativa sería al menos  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M,  $10^{-2}$  M o  $10^{-1}$  M.

50 Un agente es específico para una diana predeterminada si es capaz de unirse a dicha diana predeterminada mientras que no es (sustancialmente) capaz de unirse a otras dianas, es decir, no tiene una afinidad significativa por otras dianas y no se une significativamente a otras dianas en ensayos estándar. Preferiblemente, un agente es específico para una diana predeterminada si la afinidad y la unión a dichas otras dianas no excede significativamente la afinidad o unión a proteínas que no están relacionadas con una diana predeterminada como la albúmina de suero bovino (ASB), la caseína o albúmina de suero humano (ASH). Preferiblemente, un agente es específico para una diana predeterminada si se une a dicha diana con una  $K_D$  que es al menos 10 veces, 100 veces,  $10^3$  veces,  $10^4$  veces,  $10^5$  veces o  $10^6$  veces más bajo que la  $K_D$  para enlazar a una diana para la que no es específico. Por ejemplo, si el  $K_D$  para la unión de una diana para la que no es específico es  $10^{-7}$  M, la  $K_D$  para el enlace a una diana para el que no es específico sería al menos  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M,  $10^{-2}$  M o  $10^{-1}$  M.

55 La unión de un agente a una diana se puede determinar experimentalmente utilizando cualquier método adecuado; véase, por ejemplo, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" en Fundamental Immunology, Paul, W.E., Ed.,

Raven Press New York, NY (1984), Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company New York, NY (1992), y los métodos descritos en la presente memoria. Las afinidades pueden determinarse fácilmente utilizando técnicas convencionales, tales como por diálisis de equilibrio; utilizando el instrumento BIAcore 2000, utilizando los procedimientos generales descritos por el fabricante; por radioinmunoensayo utilizando a un antígeno diana radiomarcado; o por otro método conocido por el experto en la materia. Los datos de afinidad pueden analizarse, por ejemplo, por el método de Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51: 660 (1949). La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide en diferentes condiciones, por ejemplo, concentración de sal, pH. Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión al antígeno, por ejemplo,  $K_D$ ,  $IC_{50}$ , se realizan preferiblemente con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado.

La enseñanza puede implicar la introducción, es decir, la transfección, de ácidos nucleicos que codifican para receptores de antígenos en células tales como células T *in vitro* o *in vivo*.

Para los propósitos de la presente enseñanza, el término "transfección" incluye la introducción de un ácido nucleico a una célula o la toma de un ácido nucleico por una célula, en donde la célula puede estar presente en un sujeto, por ejemplo, un paciente. Por lo tanto, de acuerdo con la presente enseñanza, una célula para la transfección de un ácido nucleico descrito en la presente memoria puede estar presente *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, la célula puede formar parte de un órgano, un tejido y/o un organismo de un paciente. De acuerdo con la enseñanza, la transfección puede ser transitoria o estable. Para algunas aplicaciones de transfección, es suficiente si el material genético transfectado se expresa solo transitoriamente. Dado que el ácido nucleico introducido en el proceso de transfección generalmente no está integrado en el genoma nuclear, el ácido nucleico extraño se diluirá a través de la mitosis o se degradará. Las células que permiten la amplificación episomal de los ácidos nucleicos reducen en gran medida la velocidad de dilución. Si se desea que el ácido nucleico transfectado realmente permanezca en el genoma de la célula y sus células hijas, debe producirse una transfección estable. El ARN puede transfectarse en células para expresar transitoriamente a su proteína codificada.

De acuerdo con la presente enseñanza, se puede utilizar cualquier técnica útil para introducir, es decir, transferir o transfectar ácidos nucleicos en las células. Preferiblemente, el ácido nucleico tal como el ARN se transfecta en células mediante técnicas estándar. Dichas técnicas incluyen electroporación, lipofección y microinyección. En una realización particularmente preferida de la presente enseñanza, el ARN se introduce en las células por electroporación. La electroporación o electroporación se relaciona con un aumento significativo en la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana celular plasmática causada por un campo eléctrico aplicado externamente. Por lo general, se utiliza en biología molecular como una forma de introducir alguna sustancia en una célula. De acuerdo con la enseñanza, se prefiere que la introducción del ácido nucleico que codifica para una proteína o péptido en las células de como resultado la expresión de dicha proteína o péptido.

Se pueden utilizar una variedad de métodos para introducir construcciones de receptor de antígeno en las células T, incluyendo transfección de ADN no viral, sistemas basados en transposones y sistemas basados en virus. La transfección de ADN no viral tiene un bajo riesgo de mutagénesis insercional. Los sistemas basados en transposones pueden integrar a los transgenes de manera más eficiente que los plásmidos que no contienen un elemento integrador. Los sistemas basados en virus incluyen el uso de retrovirus y vectores lentivirales. Los retrovirus son relativamente fáciles de producir, transducen de manera eficiente y permanente a las células T, y han demostrado su seguridad preliminar desde el punto de vista de la integración en las células T humanas primarias. Los vectores lentivirales también transducen de manera eficiente y permanente a las células T, pero su fabricación es más costosa. También son potencialmente más seguros que los sistemas basados en retrovirus.

Para la transfección de células *in vivo*, se puede utilizar una composición farmacéutica que comprende ácido nucleico que codifica para el receptor de antígeno. Un vehículo de administración que dirige el ácido nucleico a una célula específica tal como una célula T puede administrarse a un paciente, dando como resultado una transfección que ocurre *in vivo*.

De acuerdo con la enseñanza, se prefiere administrar el ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno en forma desnuda o en un portador. Los portadores tales como los portadores de lípidos contemplados para su uso en la presente enseñanza incluyen cualquier sustancia o vehículo con el que se pueda asociar ácido nucleico como el ARN, por ejemplo, formando complejos con el ácido nucleico o formando vesículas en las que el ácido nucleico está encerrado o encapsulado. Esto puede dar como resultado una mayor estabilidad del ácido nucleico en comparación con el ácido nucleico desnudo. En particular, puede aumentar la estabilidad del ácido nucleico en la sangre. Por ejemplo, formulaciones de ARN nanoparticulado con un tamaño de partícula definido, como lipoplejos de ARN y liposomas, por ejemplo, se pueden utilizar lipoplejos que comprenden DOTMA y DOPE o DOTMA y colesterol.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "nanopartícula" se refiere a cualquier partícula que tenga un diámetro que la haga adecuada para la administración sistémica, en particular parenteral, de, en particular, ácidos nucleicos, típicamente con un diámetro de menos de 1000 nanómetros (nm) En algunas realizaciones, una nanopartícula tiene un diámetro de menos de 600 nm. En algunas realizaciones, una nanopartícula tiene un diámetro de menos de 400 nm.

- 5 Como se utiliza en la presente memoria, el término "formulación de nanopartículas" o términos similares se refieren a cualquier sustancia que contiene al menos una nanopartícula. En algunas realizaciones, una composición de nanopartículas es una colección uniforme de nanopartículas. En algunas realizaciones, las composiciones nanoparticuladas son dispersiones o emulsiones. En general, se forma una dispersión o emulsión cuando se combinan al menos dos materiales inmiscibles.
- El término "lipoplejo" o "lipoplejo de ácido nucleico", en particular "lipoplejo de ARN", se refiere a un complejo de lípidos y ácidos nucleicos, en particular ARN. Los lipoplejos se forman espontáneamente cuando los liposomas catiónicos, que a menudo también incluyen un lípido "auxiliar" neutro, se mezclan con ácidos nucleicos.
- 10 Los lípidos catiónicos, los polímeros catiónicos y otras sustancias con cargas positivas pueden formar complejos con ácidos nucleicos con carga negativa. Estas moléculas catiónicas se pueden utilizar para formar ácidos nucleicos complejos, formando así, por ejemplo, los llamados lipoplejos o polipolejos, respectivamente, y se ha demostrado que estos complejos entregan ácidos nucleicos a las células.
- 15 Las preparaciones de ácido nucleico en nanopartículas para su uso en la presente enseñanza se pueden obtener mediante diversos protocolos y a partir de diversos compuestos complejantes de ácido nucleico. Los lípidos, polímeros, oligómeros o anfífilos son agentes complejantes típicos. En una realización, el compuesto complejante comprende al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en protamina, polietilénimina, una poli-L-lisina, una poli-L-arginina o una histona.
- 20 De acuerdo con la enseñanza, la protamina es útil como agente portador catiónico. El término "protamina" se refiere a cualquiera de varias proteínas fuertemente básicas de peso molecular relativamente bajo que son ricas en arginina y que se encuentran asociadas especialmente con el ADN en lugar de histonas somáticas en las células espermáticas de varios animales (como peces). En particular, el término "protamina" se refiere a proteínas que se encuentran en los espermatozoides de los peces que son fuertemente básicas, solubles en agua, no se coagulan por calor y producen principalmente arginina tras la hidrólisis. En forma purificada, se utilizan en una formulación de insulina de acción prolongada y para neutralizar los efectos anticoagulantes de la heparina.
- 25 De acuerdo con la enseñanza, el término "protamina", como se utiliza en la presente memoria, pretende comprender cualquier secuencia de aminoácidos de protamina obtenida o derivada de fuentes nativas o biológicas que incluyen fragmentos de la misma y formas multiméricas de dicha secuencia de aminoácidos o fragmento de la misma. Además, el término abarca polipéptidos (sintetizados) que son artificiales y están diseñados específicamente para fines específicos y no pueden aislarse de fuentes nativas o biológicas.
- 30 La protamina utilizada según la presente enseñanza puede ser protamina sulfatada o clorhidrato de protamina. En una realización preferida, la fuente de protamina utilizada para la producción de las nanopartículas descritas en la presente memoria es la protamina 5000 que contiene protamina a más de 10 mg/ml (5000 unidades neutralizantes de heparina por ml) en una solución de sal isotónica.
- 35 Los liposomas son vesículas lipídicas microscópicas que a menudo tienen una o más bicapas de un lípido formador de vesículas, como un fosfolípido, y son capaces de encapsular a un fármaco. Se pueden emplear diferentes tipos de liposomas en el contexto de la presente enseñanza, que incluyen, sin limitación, vesículas multilamelares (VML), vesículas unilamelares pequeñas (VUP), vesículas unilamelares grandes (VUL), liposomas estabilizados estéricamente (LEE), vesículas multivesiculares (VM), y grandes vesículas multivesiculares (GVM), así como otras formas bicapa conocidas en la técnica. El tamaño y lamelalidad del liposoma van a depender de la forma de preparación y la selección del tipo de vesículas a utilizar dependerá del modo de administración preferido. Existen varias otras formas de organización supramolecular en las que los lípidos pueden estar presentes en un medio acuoso, que comprende fases laminares, fases hexagonales y hexagonales inversas, fases cúbicas, micelas, micelas inversas compuestas de monocapas. Estas fases también se pueden obtener en combinación con ADN o ARN, y la interacción con ARN y ADN puede afectar sustancialmente el estado de la fase. Las fases descritas pueden estar presentes en las formulaciones de ácido nucleico en nanopartículas de la presente enseñanza.
- 40
- 45
- 50 Para la formación de lipoplejos de ácido nucleico a partir de ácido nucleico y liposomas, se puede utilizar cualquier método adecuado para formar liposomas siempre que proporcione los lipoplejos de ácido nucleico previstos. Los liposomas pueden formarse utilizando métodos estándar tales como el método de evaporación inversa (EVI), el método de inyección de etanol, el método de deshidratación-rehidratación (HD), sonicación u otros métodos adecuados.
- Después de la formación de liposomas, los liposomas pueden dimensionarse para obtener una población de liposomas que tienen un intervalo de tamaños sustancialmente homogéneo.
- 55 Los lípidos formadores de la bicapa tienen típicamente dos cadenas de hidrocarburos, particularmente cadenas de acilo, y un grupo en la cabeza, polar o no polar. Los lípidos formadores de la bicapa están compuestos de lípidos naturales o de origen sintético, incluidos los fosfolípidos, como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol y esfingomielina, donde las dos cadenas de hidrocarburos están típicamente entre aproximadamente 14-22 átomos de carbono en longitud, y tienen diversos grados de insaturación. Otros lípidos adecuados para utilizar

en la composición de la presente enseñanza incluyen glicolípidos y esteroides tales como colesterol y sus diversos análogos que también pueden utilizarse en los liposomas.

Los lípidos catiónicos típicamente tienen un resto lipofílico, tal como un esteroide, una cadena de acilo o diacilo, y tienen una carga positiva neta global. El grupo en la cabeza del lípido típicamente lleva la carga positiva. El lípido catiónico tiene preferiblemente una carga positiva de 1 a 10 valencias, más preferiblemente una carga positiva de 1 a 3 valencias, y más preferiblemente una carga positiva de 1 valencia. Los ejemplos de lípidos catiónicos incluyen, pero no se limitan a 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA); dimetildioctadecilamonio (DDAB); 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP); 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP); 1,2-diaciloxi-3-dimetilamonio propanos; 1,2-dialquiloxi-3-dimetilamonio propanos; cloruro de dioctadecil-dimetilamonio (CADOD), 1,2-dimiristoiloxipropil-1,3-dimetil-hidroxi-etilamonio (DMRIE) y 2,3-dioleoiloxi-N-[2 (carboxamida de espermina)etil]-N,N-dimetil trifluoroacetato de -1-propanamio (DOSPA). Se prefieren DOTMA, DOTAP, CADOD y DOSPA. El más preferido es DOTMA.

Adicionalmente, las nanopartículas descritas en la presente memoria incluyen preferiblemente un lípido neutro en vista de la estabilidad estructural y similares. El lípido neutro se puede seleccionar apropiadamente en vista de la eficiencia de suministro del complejo ácido nucleico-lípido. Los ejemplos de lípidos neutros incluyen, pero no se limitan a, 1,2-di-(9Z-octadecenil)-sn-glicero-3-fosfo-etanolamina (DOFE), 1,2-dioleoyl-sn-glicero-3-fosfocolina (DOFC), diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidil etanolamina, ceramida, esfingomielina, cefalina, esteroide y cerebrósido. Se prefiere DOFE y/o DOFC. El más preferido es DOFE. En el caso donde un liposoma catiónico incluye tanto un lípido catiónico como un lípido neutro, la relación molar del lípido catiónico con respecto al lípido neutro puede determinarse apropiadamente en vista de la estabilidad del liposoma y similares.

De acuerdo con una realización, las nanopartículas descritas en la presente memoria pueden comprender fosfolípidos. Los fosfolípidos pueden ser un glicerofosfolípidos. Los ejemplos de glicerofosfolípidos incluyen, sin limitación a estos, tres tipos de lípidos: (i) fosfolípidos zwitteriónicos, que incluyen, por ejemplo, fosfatidilcolina (FC), fosfatidilcolina de yema de huevo, FC derivada de soja en FC natural, parcialmente hidrogenada o completamente hidrogenada forma, esfingomielina dimiristoil fosfatidilcolina (DMFC) esfingomielina (EM); (ii) fosfolípidos cargados negativamente: que incluyen, por ejemplo, fosfatidilserina (FS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (AF), fosfatidilglicerol (FG) dipalmitoil PG, dimiristoil fosfatidilglicerol (DMFG); derivados sintéticos en los que el conjugado produce un fosfolípido zwitteriónico cargado negativamente, tal es el caso de metoxi-poli-etileno, glicol-diestearoil-fosfatidiletanolamina (mPEG-DSFE); y (iii) fosfolípidos catiónicos, que incluyen, por ejemplo, fosfatidilcolina o esfingomielina de los cuales el fosfomonoéster fue O-metilado para formar a los lípidos catiónicos.

La asociación de ácido nucleico al portador lipídico puede ocurrir, por ejemplo, por el ácido nucleico que llena los espacios intersticiales del portador, de modo que el portador atrapa físicamente a el ácido nucleico, o por enlace covalente, iónico o de hidrógeno, o por medios de adsorción por enlaces no específicos. Cualquiera que sea el modo de asociación, el ácido nucleico debe retener sus propiedades terapéuticas, es decir, codificantes.

De acuerdo con la enseñanza, el ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno en una realización es ARN, preferiblemente ARNm. El ARN se obtiene preferiblemente por transcripción *in vitro*.

El término "ácido nucleico", como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir ADN y ARN tales como ADN genómico, ADNc, ARNm, moléculas producidas recombinantemente y sintetizadas químicamente. Un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. El ARN incluye ARN transcrito *in vitro* (ARN IVT) o ARN sintético. Según las enseñanzas, un ácido nucleico es preferiblemente un ácido nucleico aislado.

Los ácidos nucleicos pueden estar comprendidos en un vector. El término "vector" tal como se utiliza en la presente memoria incluye a cualquier vector conocido por la persona experta, incluidos vectores plasmídicos, vectores cósmidos, vectores de fagos tales como fagos lambda, vectores virales tales como vectores adenovirales o baculovirales, o vectores cromosómicos artificiales tales como cromosomas artificiales bacterianos (CAB), cromosomas artificiales de levadura (CAL) o cromosomas artificiales P1 (CAP). Dichos vectores incluyen expresión, así como vectores de clonación. Los vectores de expresión comprenden plásmidos, así como vectores virales y generalmente contienen una secuencia codificante deseada y secuencias de ADN apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped en particular (por ejemplo, bacterias, levaduras, plantas, insectos o mamíferos) o en sistemas de expresión *in vitro*. Los vectores de clonación se utilizan generalmente para diseñar y amplificar un fragmento de ADN deseado y pueden carecer de secuencias funcionales necesarias para la expresión de los fragmentos de ADN deseados.

En el contexto de la presente enseñanza, el término "ARN" se refiere a una molécula que comprende residuos de ribonucleótidos y preferiblemente está compuesta total o sustancialmente por residuos de ribonucleótidos. "Ribonucleótido" se refiere a un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo β-D-ribofuranosilo. El término incluye ARN de doble cadena, ARN de cadena sencilla, ARN aislado como ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido de forma recombinante, así como ARN modificado que difiere del ARN natural por la adición, eliminación, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, como el (los) extremo(s) de un ARN o internamente, por ejemplo, en uno o más nucleótidos del ARN. Los nucleótidos en las moléculas de ARN también pueden comprender nucleótidos

no estándar, tales como nucleótidos que no se producen naturalmente o nucleótidos o desoxinucleótidos sintetizados químicamente. Estos ARN alterados pueden denominarse análogos o análogos de ARN natural.

De acuerdo con la presente enseñanza, el término "ARN" incluye y preferiblemente se refiere a "ARNm" que significa "ARN mensajero" y se refiere a una "transcrito" que puede producirse utilizando ADN como molde y codifica para un péptido o proteína. El ARNm típicamente comprende una región no traducida 5' (5'-RNT), una región codificante para proteínas o péptidos y una región no traducida 3' (3'-RNT). El ARNm tiene una vida media limitada en las células e *in vitro*. Preferiblemente, el ARNm se produce por transcripción *in vitro* utilizando un molde de ADN. En una realización de la enseñanza, el ARN se obtiene por transcripción *in vitro* o por síntesis química. La metodología de transcripción *in vitro* es conocida por la persona experta. Por ejemplo, hay una variedad de kits de transcripción *in vitro* disponibles comercialmente.

En una realización de la presente enseñanza, el ARN es ARN autorreplicante, tal como ARN autorreplicante de cadena sencilla. En una realización, el ARN autorreplicante es ARN de cadena sencilla de sentido positivo. En una realización, el ARN autorreplicante es ARN viral o ARN derivado de ARN viral. En una realización, el ARN autorreplicante es ARN genómico alfavírico o se deriva del ARN genómico alfavírico. En una realización, el ARN autorreplicante es un vector de expresión génica viral. En una realización, el virus es el virus del bosque Semliki. En una realización, el ARN autorreplicante contiene uno o más transgenes, al menos uno de dichos transgenes que codifican para los agentes descritos en la presente memoria. En una realización, si el ARN es ARN viral o derivado de ARN viral, los transgenes pueden reemplazar parcial o completamente a secuencias virales tales como secuencias virales que codifican proteínas estructurales. En una realización, el ARN autorreplicante es ARN transcrito *in vitro*.

Para aumentar la expresión y/o la estabilidad del ARN utilizado de acuerdo con la presente enseñanza, puede modificarse, preferiblemente sin alterar la secuencia del péptido o de la proteína expresada.

El término "modificación" en el contexto de ARN tal como se utiliza según la presente enseñanza incluye cualquier modificación de ARN que no está naturalmente presente en dicho ARN.

En una realización de la enseñanza, el ARN utilizado de acuerdo con la enseñanza no tiene 5'-trifosfatos sin tapa. La eliminación de tales 5'-trifosfatos sin tapa se puede lograr tratando el ARN con una fosfatasa.

El ARN de acuerdo con la enseñanza puede haber modificado los ribonucleótidos naturales o sintéticos para aumentar su estabilidad y/o disminuir la citotoxicidad. Por ejemplo, en una realización, en el ARN utilizado de acuerdo con la enseñanza, la 5-metilcitosina se sustituye parcial o completamente, preferiblemente por completo, por citidina. Alternativa o adicionalmente, en una realización, en el ARN utilizado de acuerdo con la enseñanza, la pseudouridina se sustituye parcial o completamente, preferiblemente por completo, por la uridina.

En una realización, el término "modificación" se refiere a proporcionar un ARN con 5' con tapa o un análogo de 5' con tapa. El término "5'-con tapa" se refiere a una estructura de tapa que se encuentra en el extremo 5' de una molécula de ARNm y generalmente consiste en un nucleótido de guanosina conectado al ARNm a través de un enlace inusual de trifosfato de 5' a 5'. En una realización, esta guanosina se metila en la posición 7. El término "5' con tapa convencional" se refiere a una tapa 5' de ARN natural, preferiblemente a la tapa 7-metilguanósina (m7G). En el contexto de la presente enseñanza, el término "5'-con tapa" incluye un análogo de 5'-con tapa que se asemeja a la estructura de la tapa de ARN y se modifica para poseer la capacidad de estabilizar a el ARN si está unido a la misma, preferiblemente *in vivo* y/o en una célula.

El suministro de un ARN con 5' con tapa o un análogo de 5' con tapa se puede lograr mediante la transcripción *in vitro* de un molde de ADN en presencia de dicho 5' con tapa o un análogo de 5' con tapa, en el que dicho 5'-con tapa se incorpora co-transcripcionalmente en la cadena de ARN generada, o el ARN puede generarse, por ejemplo, mediante transcripción *in vitro*, y la tapa de 5' puede unirse al ARN después de la transcripción utilizando enzimas de tapa, por ejemplo, las enzimas de tapa del virus vaccinia.

El ARN puede comprender modificaciones adicionales. Por ejemplo, una modificación adicional del ARN utilizado en la presente enseñanza puede ser una extensión o truncamiento de la cola de poli(A) que ocurre naturalmente o una alteración de las regiones no traducidas (RNT) 5' o 3', como la introducción de una RNT que no está relacionada con la región de codificación de dicho ARN, por ejemplo, la inserción de uno o más, preferiblemente dos copias de una RNT-3' derivada de un gen de globina, como alfa2-globina, alfa1-globina, beta-globina, preferiblemente beta-globina, más preferiblemente beta-globina humana.

Por lo tanto, para aumentar la estabilidad y/o la expresión del ARN utilizado de acuerdo con la presente enseñanza, se puede modificar para que esté presente junto con una secuencia poli-A, que preferiblemente tiene una longitud de 10 a 500, más preferiblemente de 30 a 300, incluso más preferiblemente de 65 a 200 y especialmente de 100 a 150 residuos de adenosina. En una realización especialmente preferida, la secuencia poli-A tiene una longitud de aproximadamente 120 residuos de adenosina. Además, la incorporación de dos o más regiones 3' no traducidas (RNT) en la región 3' no traducida de una molécula de ARN puede dar como resultado una mejora en la eficiencia de la traducción. En una realización particular, la RNT-3' se deriva del gen de la  $\beta$ -globina humana.

El término "estabilidad" del ARN se refiere a la "vida media" del ARN. La "vida media" se refiere al período de tiempo que se necesita para eliminar la mitad de la actividad, cantidad o número de moléculas. En el contexto de la presente enseñanza, la vida media de un ARN es indicativa de la estabilidad de dicho ARN. La vida media del ARN puede influir en la "duración de la expresión" del ARN. Se puede esperar que el ARN que tiene una vida media larga se exprese durante un período de tiempo prolongado.

En el contexto de la presente enseñanza, el término "transcripción" se refiere a un proceso, en el que el código genético en una secuencia de ADN se transcribe en ARN. Posteriormente, el ARN puede traducirse en proteína. De acuerdo con la presente enseñanza, el término "transcripción" comprende "transcripción *in vitro*", en el que el término "transcripción *in vitro*" se refiere a un proceso en el que el ARN, en particular el ARNm, se sintetiza *in vitro* en un sistema libre de células, preferiblemente utilizando extractos celulares apropiados. Preferiblemente, los vectores de clonación se aplican para la generación de transcripciones. Estos vectores de clonación generalmente se designan como vectores de transcripción y están de acuerdo con el término "vector" abarcado en la presente enseñanza.

El término "traducción" de acuerdo con la enseñanza se refiere al proceso en los ribosomas de una célula mediante el cual una cadena de ARN mensajero dirige el ensamblaje de una secuencia de aminoácidos para formar un péptido o una proteína.

Los ácidos nucleicos pueden, de acuerdo con la enseñanza, estar presentes solos o en combinación con otros ácidos nucleicos, que pueden ser homólogos o heterólogos. En realizaciones preferidas, un ácido nucleico está funcionalmente unido a secuencias de control de expresión que pueden ser homólogas o heterólogas con respecto a dicho ácido nucleico. El término "homólogo" significa que los ácidos nucleicos también están funcionalmente unidos naturalmente y el término "heterólogo" significa que los ácidos nucleicos no están funcionalmente unidos naturalmente.

Un ácido nucleico y una secuencia de control de expresión están unidos "funcionalmente" entre sí, si están unidos covalentemente entre sí de tal manera que la expresión o transcripción de dicho ácido nucleico esté bajo el control o bajo la influencia de dicha secuencia de control de expresión. Si el ácido nucleico se va a traducir en una proteína funcional, entonces, con una secuencia de control de expresión funcionalmente unida a una secuencia de codificación, la inducción de dicha secuencia de control de expresión da como resultado la transcripción de dicho ácido nucleico, sin causar un cambio de marco en la secuencia de codificación o dicha secuencia de codificación no es capaz de traducirse en la proteína o en el péptido deseados.

El término "secuencia de control de la expresión" o "elemento de control de la expresión" comprende, de acuerdo con la enseñanza, promotores, sitios de unión a ribosoma, potenciadores y otros elementos de control que regulan la transcripción de un gen o la traducción de un ARNm. En realizaciones particulares de la enseñanza, las secuencias de control de expresión pueden regularse. La estructura exacta de las secuencias de control de la expresión puede variar en función de la especie o el tipo de célula, pero generalmente comprende secuencias 5' no transcritas y 5' y 3' no traducidas que están involucradas en el inicio de la transcripción y de la traducción, respectivamente, como la caja TATA, secuencia de tapa, secuencia CAAT y similares. Más específicamente, las secuencias de control de expresión 5' no transcritas comprenden una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico funcionalmente unido. Las secuencias de control de la expresión también pueden comprender secuencias potenciadoras o secuencias activadoras río arriba.

El término "expresión" se utiliza de acuerdo con las enseñanzas en su significado más general y comprende la producción de ARN y/o péptidos o proteínas, por ejemplo, por transcripción y/o traducción. Con respecto al ARN, el término "expresión" o "traducción" se refiere en particular a la producción de péptidos o proteínas. También comprende la expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede ser transitoria o estable. De acuerdo con la enseñanza, el término expresión también incluye una "expresión aberrante" o "expresión anormal".

"Expresión aberrante" o "expresión anormal" significa de acuerdo con la enseñanza que la expresión está alterada, preferiblemente aumentada, en comparación con una referencia, por ejemplo, un estado en un sujeto que no tiene una enfermedad asociada con la expresión aberrante o anormal de una determinada proteína, por ejemplo, un antígeno tumoral. Un aumento en la expresión se refiere a un aumento de al menos el 10%, en particular al menos 20%, al menos 50% o al menos 100%, o más. En una realización, la expresión solo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano está reprimida.

El término "expresado específicamente" significa que una proteína se expresa esencialmente solamente en un tejido o en un órgano específicos. Por ejemplo, un antígeno tumoral expresado específicamente en la mucosa gástrica significa que dicha proteína se expresa principalmente en la mucosa gástrica y no se expresa en otros tejidos o no se expresa en un grado significativo en otros tipos de tejidos u órganos. Por lo tanto, una proteína que se expresa exclusivamente en las células de la mucosa gástrica y, en menor medida, en cualquier otro tejido, como los testículos, se expresa específicamente en las células de la mucosa gástrica. En algunas realizaciones, un antígeno tumoral también puede expresarse específicamente en condiciones normales en más de un tipo de tejido u órgano, tal como en 2 o 3 tipos de tejido u órganos, pero preferiblemente en no más de 3 tipos diferentes de tejidos u órganos. En este caso, el antígeno tumoral se expresa específicamente en estos órganos. Por ejemplo, si un antígeno tumoral se expresa en condiciones normales, preferiblemente en un grado aproximadamente igual en pulmón y en estómago, dicho antígeno tumoral se expresa específicamente en pulmón y en estómago.

De acuerdo con la enseñanza, el término "codificación de ácido nucleico" significa que el ácido nucleico, si está presente en el entorno apropiado, preferiblemente dentro de una célula, puede expresarse para producir a la proteína o al péptido que codifica.

5 El término "péptido" de acuerdo con la enseñanza comprende oligo y polipéptidos y se refiere a sustancias que comprenden dos o más, preferiblemente 3 o más, preferiblemente 4 o más, preferiblemente 6 o más, preferiblemente 8 o más, preferiblemente 9 o más, preferiblemente 10 o más, preferiblemente 13 o más, preferiblemente 16 más, preferiblemente 21 o más y preferiblemente hasta 8, 10, 20, 30, 40 o 50, en particular 100 aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. El término "proteína" se refiere a péptidos grandes, preferiblemente a péptidos con más de 100 residuos de aminoácidos, pero en general los términos "péptido", "cadena peptídica" y "proteína" son sinónimos y se utilizan indistintamente en el presente documento.

10 Como se mencionó anteriormente, las secuencias de aminoácidos de las cadenas peptídicas y los receptores de antígeno descritos en la presente memoria pueden modificarse para obtener variantes de dichas secuencias de aminoácidos.

15 En consecuencia, la presente enseñanza incluye variantes de las secuencias peptídicas y proteínas descritas en la presente memoria e incluye variantes de secuencias de aminoácidos naturales que dan como resultado secuencias que son funcionalmente equivalentes a dichas secuencias, por ejemplo, secuencias de aminoácidos que exhiben propiedades idénticas o similares a las de dichas secuencias. Las propiedades importantes son la retención de la unión de un receptor de antígeno a su diana o la transducción de la señal de unión al antígeno a una célula tal como una célula T. En una realización, una molécula o secuencia variante es inmunológicamente equivalente a su molécula o secuencia parental.

20 El término "variante" de acuerdo con la enseñanza se refiere, en particular, a mutantes, variantes de corte y empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular aquellos que están naturalmente presentes. Una variante alélica se relaciona con una alteración en la secuencia normal de un gen, cuya importancia a menudo no está clara. La secuenciación genética completa a menudo identifica numerosas variantes alélicas para un gen dado. Un homólogo de especie es una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos con una especie de origen diferente de la de una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos dada. El término "variante" abarcará todas las variantes modificadas postraduccionalmente y las variantes de conformación.

25 El término "inmunológicamente equivalente" significa que la molécula inmunológicamente equivalente tal como la secuencia de aminoácidos inmunológicamente equivalente exhibe las mismas o esencialmente las mismas propiedades inmunológicas y/o ejerce los mismos o esencialmente los mismos efectos inmunológicos, por ejemplo, con respecto al tipo del efecto inmunológico. En el contexto de la presente enseñanza, el término "inmunológicamente equivalente" se utiliza preferiblemente con respecto a los efectos inmunológicos o propiedades de los receptores de antígeno utilizados para terapia.

30 Los expertos en la materia apreciarán que, en particular, las secuencias de las secuencias de RDC, las regiones hipervariables y variables pueden modificarse sin perder la capacidad de unirse a una diana. Por ejemplo, las regiones RDC pueden ser idénticas o altamente homólogas a las regiones de anticuerpos parentales. Por "altamente homólogo" se contempla que de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, tales como 1 a 3 ó 1 o 2 sustituciones pueden hacerse en las RDC.

35 Para los propósitos de la presente enseñanza, las "variantes" de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de adición de aminoácidos, variantes de eliminación de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos. Las variantes de delección de aminoácidos que comprenden la delección en el extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína también se denominan variantes de truncamiento de N-terminal y/o C-terminal.

40 Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden inserciones de uno o dos o más aminoácidos en una secuencia de aminoácidos en particular. En el caso de las variantes de secuencia de aminoácidos que tienen una inserción, uno o más residuos de aminoácidos se insertan en un sitio particular en una secuencia de aminoácidos, aunque también es posible la inserción aleatoria con el cribado apropiado del producto resultante.

45 Las variantes de adición de aminoácidos comprenden fusiones del amino y/o el carboxilo terminal de uno o más aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos.

50 Las variantes de delección de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia, tal como por la eliminación de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos. Las delecciones pueden estar en cualquier posición de la proteína.

55 Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por que al menos un residuo en la secuencia se elimina y otro residuo se inserta en su lugar. Se da preferencia a las modificaciones que se encuentran en posiciones en la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre proteínas o péptidos homólogos y/o al reemplazo de aminoácidos con otros que tienen propiedades similares. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteínas son cambios conservativos de aminoácidos, es decir, sustituciones de aminoácidos con carga

similar o sin carga. Un cambio conservativo de aminoácidos implica la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos de origen natural generalmente se dividen en cuatro familias: ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y polares sin carga (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos.

Preferiblemente, el grado de similitud, preferiblemente la identidad entre una secuencia de aminoácidos dada y una secuencia de aminoácidos que es una variante de dicha secuencia de aminoácidos dada será al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99%. El grado de similitud o identidad se da preferiblemente para una región de aminoácidos que es al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o aproximadamente 100% de la longitud total de la secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos de referencia consta de 200 aminoácidos, el grado de similitud o identidad se da preferiblemente por al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180 o aproximadamente 200 aminoácidos, preferiblemente aminoácidos continuos. En realizaciones preferidas, se da el grado de similitud o identidad para toda la longitud de la secuencia de aminoácidos de referencia. El alineamiento para determinar la similitud de secuencia, preferiblemente la identidad de la secuencia, se puede hacer con herramientas conocidas en la técnica, preferiblemente utilizando el mejor alineamiento de secuencia, por ejemplo, utilizando Alinear, utilizando configuraciones estándar, preferiblemente EMBOSS:: needle, Matriz: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5.

La "similitud de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones conservativas de aminoácidos. La "identidad de secuencia" entre dos secuencias de aminoácidos indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias.

El término "porcentaje de identidad" pretende denotar un porcentaje de residuos de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenidas después del mejor alineamiento, siendo este porcentaje puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen al azar y en toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente comparando estas secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, dicha comparación se lleva a cabo por segmento o por "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación se puede producir, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Ads App. Mates.* 2, 482, mediante el algoritmo de homología local de Neddleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, o por medio de programas de computadora que utilizan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, dividiendo este número por el número de posiciones comparadas y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias

Las secuencias de aminoácidos homólogas exhiben de acuerdo con la enseñanza al menos 40%, en particular al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% y preferiblemente al menos 95%, al menos 98 o al menos 99% de identidad de los residuos de aminoácidos

De acuerdo con la enseñanza, una variante, fragmento, parte, porción o derivado de una secuencia de aminoácidos, péptido o proteína tiene preferiblemente una propiedad funcional de la secuencia de aminoácidos, péptido o proteína, respectivamente, de la que se ha derivado, es decir, es funcionalmente equivalente. En una realización, una variante, fragmento, parte, porción o derivado de una secuencia de aminoácidos, péptido o proteína es funcionalmente equivalente tal como inmunológicamente equivalente a la secuencia de aminoácidos, péptido o proteína, respectivamente, de la cual se ha derivado. En una realización, la propiedad funcional es la propiedad de unirse al antígeno o transducir la señal de unión dentro de una célula.

El término "derivado" significa, de acuerdo con la enseñanza, que una entidad particular, en particular una secuencia particular, está presente en el objeto del cual se deriva, en particular un organismo o molécula. En el caso de las secuencias de aminoácidos, especialmente regiones de secuencias particulares, "derivado" en particular significa que la secuencia de aminoácidos relevante se deriva de una secuencia de aminoácidos en la cual está presente.

El término "célula" o "célula huésped" se refiere preferiblemente a una célula intacta, es decir, una célula con una membrana intacta que no ha liberado sus componentes intracelulares normales tales como enzimas, organelos o material genético. Una célula intacta es preferiblemente una célula viable, es decir, una célula viva capaz de llevar a cabo sus funciones metabólicas normales. Preferiblemente, dicho término se refiere de acuerdo con las enseñanzas

a cualquier célula que pueda transfectarse con un ácido nucleico exógeno. Preferiblemente, la célula cuando se transfecta con un ácido nucleico exógeno y se transfiere a un receptor puede expresar el ácido nucleico en el receptor. El término "célula" incluye células bacterianas; otras células útiles son células de levadura, células fúngicas o células de mamífero. Las células bacterianas adecuadas incluyen células de cepas bacterianas gram-negativas tales como cepas de *Escherichia coli*, *Proteus* y *Pseudomonas*, y cepas bacterianas gram-positivas como cepas de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus* y *Lactococcus*. Las células fúngicas adecuadas incluyen células de especies de *Trichoderma*, *Neurospora* y *Aspergillus*. Las células de levadura adecuadas incluyen células de especies de *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (por ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (por ejemplo, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*) y *Hansenula*. Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, células CHO, células BHK, células HeLa, células COS, 293 HEK y similares. Sin embargo, también pueden utilizarse células de anfibios, células de insectos, células vegetales y cualquier otra célula utilizada en la técnica para la expresión de proteínas heterólogas. Las células de mamíferos son particularmente preferidas para la transferencia adoptiva, como las células de humanos, ratones, hámsters, cerdos, cabras y primates. Las células pueden derivarse de una gran cantidad de tipos de tejidos e incluyen células primarias y líneas celulares tales como células del sistema inmune, en particular células presentadoras de antígeno como células dendríticas y células T, células madre como células madre hematopoyéticas y células madre mesenquimales y otros tipos de células. Las células particularmente preferidas para su uso de acuerdo con la enseñanza son las células inmunorreactivas o efectoras inmunes, en particular las células T.

Una célula que comprende una molécula de ácido nucleico preferiblemente expresa el péptido o la proteína codificada por el ácido nucleico.

El término "expansión clonal" o "expansión" se refiere a un proceso en el que una entidad específica se multiplica. En el contexto de la presente enseñanza, el término se utiliza preferiblemente en el contexto de una respuesta inmunológica en la que los linfocitos son estimulados por un antígeno, proliferan y el linfocito específico que reconoce dicho antígeno se amplifica. Preferiblemente, la expansión clonal conduce a la diferenciación de los linfocitos. El término "cebado" se refiere a un proceso en el que una célula T tiene su primer contacto con su antígeno específico y provoca la diferenciación en células T efectoras.

Las moléculas tales como ácidos nucleicos, cadenas peptídicas o receptores de antígeno, o células descritas en la presente memoria pueden ser recombinantes y/o aisladas.

El término "aislado" como se utiliza en la presente memoria, pretende referirse a una entidad que está sustancialmente libre de otras moléculas tales como otro material celular. El término "aislado" significa preferiblemente que la entidad aislada ha sido separada de su entorno natural. Una entidad aislada puede estar en un estado esencialmente purificado. El término "esencialmente purificado" significa preferiblemente que la entidad está esencialmente libre de otras sustancias con las que está asociada en la naturaleza o *in vivo*.

El término "recombinante" en el contexto de la presente enseñanza significa "hecho mediante ingeniería genética". Preferiblemente, un "objeto recombinante" tal como una célula recombinante en el contexto de la presente enseñanza no está ocurriendo naturalmente.

El término "que ocurre naturalmente" como se utiliza en la presente memoria se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, un péptido o ácido nucleico que está presente en un organismo (incluidos los virus) y puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio es que ocurre naturalmente.

El término "autólogo" se utiliza para describir cualquier cosa que se deriva del mismo sujeto. Por ejemplo, "trasplante autólogo" se refiere a un trasplante de tejido u órganos derivados del mismo sujeto. Tales procedimientos son ventajosos porque superan la barrera inmunológica que de otro modo da como resultado el rechazo.

El término "alogénico" se utiliza para describir cualquier cosa que se deriva de diferentes individuos de la misma especie. Se dice que dos o más individuos son alogénicos entre sí cuando los genes en uno o más loci no son idénticos.

El término "singénico" se utiliza para describir cualquier cosa que se deriva de individuos o tejidos que tienen genotipos idénticos, es decir, gemelos o animales idénticos de la misma cepa endogámica, o sus tejidos.

El término "heterólogo" se utiliza para describir algo que consiste en múltiples elementos diferentes. Como ejemplo, la transferencia de la médula ósea de un individuo a un individuo diferente constituye un trasplante heterólogo. Un gen heterólogo es un gen derivado de una fuente distinta del sujeto.

"Reducir" o "inhibir" como se utiliza en la presente memoria significa la capacidad de causar una disminución global, preferiblemente de 5% o mayor, 10% o mayor, 20% o mayor, más preferiblemente de 50% o mayor, y lo más preferiblemente de 75% o mayor, en el nivel. El término "inhibir" o frases similares incluye una inhibición completa o esencialmente completa, es decir, una reducción a cero o esencialmente a cero.

Términos tales como "aumentar" o "mejorar" se refieren preferiblemente a un aumento o mejora en aproximadamente al menos 10%, preferiblemente al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 80%, y lo más preferiblemente al menos 100%.

5 Dado que un receptor de antígeno de la presente enseñanza se puede diseñar para atacar virtualmente a cualquier antígeno, incluidos los antígenos específicos de la enfermedad, un receptor de antígeno de la presente enseñanza tiene un amplio uso terapéutico. En consecuencia, la presente enseñanza está dirigida al uso de un receptor de antígeno de la enseñanza, sus cadenas peptídicas, ácidos nucleicos que lo codifican y otras moléculas relacionadas en métodos terapéuticos y profilácticos. Uno de estos usos es en la producción de células inmunes específicas de antígeno, que pueden administrarse a un paciente para prevenir o tratar una enfermedad, enfermedad que se caracteriza por la expresión de uno o más antígenos que pueden unirse por un receptor de antígeno de la enseñanza expresado en las células inmunes. Preferiblemente, la enfermedad es cáncer. Además, un receptor de antígeno de la enseñanza y moléculas relacionadas también se pueden utilizar para la erradicación selectiva de células que expresan un antígeno predeterminado, así como para la inmunización o vacunación contra una enfermedad en la que se expresa un antígeno predeterminado, cuyo antígeno puede unirse al menos a un sitio de unión al antígeno de un receptor de antígeno de la enseñanza.

En una realización, un método para tratar o prevenir una enfermedad comprende administrar a un paciente una cantidad eficaz de un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno de la enseñanza, en el que al menos un sitio de unión al antígeno del receptor de antígeno puede unirse a un antígeno que está asociado con la enfermedad (por ejemplo, un antígeno viral o tumoral) para ser tratado o prevenido. En otra realización, un método para tratar o prevenir una enfermedad comprende administrar a un paciente una cantidad eficaz de una célula efectora inmune recombinante o una población expandida de dichas células efectoras inmunes, cuya célula o población efectora inmunitaria expresa de forma recombinante un receptor de antígeno de la enseñanza, en la que al menos un sitio de unión al antígeno del receptor de antígeno puede unir un antígeno que está asociado con la enfermedad a tratar o prevenir. En realizaciones preferidas, la enfermedad es cáncer y el antígeno es un antígeno asociado a un tumor.

En otra realización, la presente enseñanza proporciona un método para inmunizar o vacunar contra una enfermedad asociada con un antígeno específico o contra un organismo causante de una enfermedad que expresa un antígeno específico, cuyo método comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno de la enseñanza, en el que al menos un sitio de unión al antígeno del receptor de antígeno puede unirse al antígeno específico. En otra realización, la presente enseñanza proporciona un método para inmunizar o vacunar contra una enfermedad asociada con un antígeno específico o contra un organismo causante de una enfermedad que expresa un antígeno específico, cuyo método comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de una célula efectora inmune o una población expandida de dichas células efectoras inmunes, cuya célula efectora inmune o población de células expresa recombinantemente un receptor de antígeno de la enseñanza, en el que al menos un sitio de unión al antígeno del receptor de antígeno es capaz de unirse al antígeno específico.

En ciertas realizaciones, la población de células efectoras inmunes puede ser una población clonalmente expandida. Las células recombinantes efectoras inmunes o las poblaciones de las mismas proporcionan la función efectora inmune terapéutica o profiláctica de una manera específica al antígeno. Preferiblemente, un receptor de antígeno de la enseñanza se expresa en la superficie celular de la célula efectora inmune.

40 Las células utilizadas en relación con los métodos terapéuticos y profilácticos de la presente enseñanza son preferiblemente células efectoras inmunes y las células efectoras inmunes son preferiblemente células T. En particular, las células utilizadas en la presente memoria son linfocitos citotóxicos, preferiblemente seleccionados de células T citotóxicas, células asesinas naturales (AN) y células asesinas activadas por linfocinas (AAL). Tras la activación/estimulación, cada uno de estos linfocitos citotóxicos desencadena la destrucción de las células diana. Por ejemplo, las células T citotóxicas desencadenan la destrucción de las células diana por uno o ambos de los siguientes medios. Primero, tras la activación, las células T liberan citotoxinas como perforina, granzimas y granzolisina. La perforina y la granzolisina crean poros en la célula diana, y las granzimas ingresan a la célula y desencadenan una cascada de caspasas en el citoplasma que inducen la apoptosis (muerte celular programada) de la célula. En segundo lugar, la apoptosis puede inducirse mediante la interacción del ligando Fas-Fas entre las células T y las células tumorales diana. Las células T y otros linfocitos citotóxicos serán preferiblemente células autólogas, aunque pueden utilizarse células heterólogas o células alogénicas.

Por consiguiente, los agentes, las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para tratar a un sujeto con una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad caracterizada por la presencia de células enfermas que expresan un antígeno. Las enfermedades particularmente preferidas son las enfermedades cancerígenas.

Los agentes, composiciones y métodos descritos en la presente memoria también pueden utilizarse para la inmunización o vacunación para prevenir una enfermedad descrita en la presente memoria.

El término "enfermedad" se refiere a una condición anormal que afecta el cuerpo de un individuo. Una enfermedad a menudo se interpreta como una condición médica asociada con síntomas y signos específicos. Una enfermedad puede

ser causada por factores originarios de una fuente externa, como una enfermedad infecciosa, o puede ser causada por disfunciones internas, como las enfermedades autoinmunes. En humanos, "enfermedad" a menudo se utiliza de manera más amplia para referirse a cualquier condición que causa dolor, disfunción, angustia, problemas sociales o muerte al individuo afectado, o problemas similares para aquellos en contacto con el individuo. En este sentido más amplio, a veces incluye lesiones, discapacidades, trastornos, síndromes, infecciones, síntomas aislados, comportamientos desviados y variaciones atípicas de estructura y función, mientras que en otros contextos y para otros fines, estos pueden considerarse categorías distinguibles. Las enfermedades generalmente afectan a los individuos no solo físicamente, sino también emocionalmente, ya que contraer y vivir con muchas enfermedades puede alterar la perspectiva de la vida y la personalidad. De acuerdo con la enseñanza, el término "enfermedad" incluye enfermedades infecciosas y enfermedades cancerígenas, en particular aquellas formas de cáncer descritas en la presente memoria. Cualquier referencia en la presente memoria al cáncer o formas particulares de cáncer también incluye metástasis de cáncer del mismo.

Una enfermedad por tratar, de acuerdo con la enseñanza, es preferiblemente una enfermedad que implica a un antígeno. "Enfermedad que implica un antígeno", "enfermedad asociada con la expresión o expresión elevada de un antígeno" o expresiones similares significan, de acuerdo con la enseñanza, que el antígeno se expresa en células de un tejido u órgano enfermo. La expresión en las células de un tejido u órgano enfermo puede aumentar en comparación con el estado en un tejido u órgano sano. En una realización, la expresión solamente se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano no se encuentra, por ejemplo, la expresión está reprimida. De acuerdo con la enseñanza, las enfermedades que implican un antígeno incluyen enfermedades infecciosas y enfermedades cancerígenas, en las que el antígeno asociado a la enfermedad es preferiblemente un antígeno del agente infeccioso y un antígeno tumoral, respectivamente. Preferiblemente, una enfermedad que involucra un antígeno es preferiblemente una enfermedad que involucra células que expresan un antígeno, preferiblemente en la superficie celular.

El término "sano" o "normal" se refiere a afecciones no patológicas, y preferiblemente significa no infectado o no cancerígeno.

Los términos "enfermedad cancerígena" o "cáncer" se refieren o describen la condición fisiológica en un individuo que típicamente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Más particularmente, ejemplos de tales cánceres incluyen cáncer de huesos, cáncer de sangre, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer uterino, carcinoma de los órganos sexuales y reproductivos, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma y adenoma pituitario. El término "cáncer" de acuerdo con la enseñanza también comprende metástasis de cáncer. Preferiblemente, una "enfermedad cancerígena" se caracteriza por células que expresan un antígeno tumoral y una célula cancerígena expresa a un antígeno tumoral.

En una realización, una enfermedad cancerígena es una enfermedad maligna que se caracteriza por las propiedades de la anaplasia, la invasividad y la metástasis. Un tumor maligno puede contrastarse con un tumor benigno no cancerígeno en que un tumor maligno no se autolimita en su crecimiento, puede invadir tejidos adyacentes y puede propagarse a tejidos distantes (metástasis), mientras que un tumor benigno no tiene ninguna de esas propiedades.

De acuerdo con la enseñanza, el término "tumor" o "enfermedad tumoral" se refiere a una hinchazón o lesión formada por un crecimiento anormal de células (llamadas células neoplásicas o células tumorales). Por "célula tumoral" se entiende una célula anormal que crece mediante una proliferación celular rápida e incontrolada y continúa creciendo después de que cesan los estímulos que iniciaron el nuevo crecimiento. Los tumores muestran una falta parcial o completa de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal, y generalmente forman una masa de tejido distinta, que puede ser benigna, premaligna o maligna.

De acuerdo con la enseñanza, un "carcinoma" es un tumor maligno derivado de células epiteliales. Este grupo representa los cánceres más comunes, incluidas las formas comunes de cáncer de mama, próstata, pulmón y colon.

El "adenocarcinoma" es un cáncer que se origina en el tejido glandular. Este tejido también forma parte de una categoría de tejido más grande conocida como tejido epitelial. El tejido epitelial incluye piel, glándulas y una variedad de otros tejidos que recubren las cavidades y los órganos del cuerpo. El epitelio se deriva embriológicamente del ectodermo, el endodermo y el mesodermo. Para clasificarse como adenocarcinoma, las células no necesariamente deben ser parte de una glándula, siempre y cuando tengan propiedades secretoras. Esta forma de carcinoma puede ocurrir en algunos mamíferos superiores, incluidos los humanos. Los adenocarcinomas bien diferenciados tienden a parecerse al tejido glandular del que derivan, mientras que los mal diferenciados pueden no serlo. Al teñir las células de una biopsia, un patólogo determinará si el tumor es un adenocarcinoma o algún otro tipo de cáncer. Los adenocarcinomas pueden surgir en muchos tejidos del cuerpo debido a la naturaleza ubicua de las glándulas dentro del cuerpo. Si bien es posible que cada glándula no esté secretando la misma sustancia, siempre que haya una función

exocrina en la célula, se considera glandular y, por lo tanto, su forma maligna se denomina adenocarcinoma. Los adenocarcinomas malignos invaden otros tejidos y a menudo hacen metástasis con el tiempo suficiente para hacerlo. El adenocarcinoma de ovario es el tipo más común de carcinoma de ovario. Incluye los adenocarcinomas serosos y mucinosos, el adenocarcinoma de células claras y el adenocarcinoma endometriode.

- 5 El linfoma y la leucemia son tumores malignos derivados de células hematopoyéticas (formadoras de sangre).

El tumor blástico o blastoma es un tumor (generalmente maligno) que se asemeja a un tejido inmaduro o embrionario. Muchos de estos tumores son más comunes en niños.

- 10 Por "metástasis" se entiende la propagación de células cancerígenas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de la metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de células malignas del tumor primario, la invasión de la matriz extracelular, la penetración de las membranas basales endoteliales para ingresar en la cavidad corporal y los vasos, y luego, después de ser transportado por la sangre, la infiltración de órganos diana. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el sitio diana depende de la angiogénesis. La metástasis tumoral a menudo ocurre incluso después de la extirpación del tumor primario porque las células o componentes tumorales pueden permanecer y desarrollar potencial metastásico. En una realización, el término "metástasis" de acuerdo con la enseñanza se refiere a "metástasis a distancia" que se refiere a una metástasis que está alejada del tumor primario y del sistema regional de nódulos linfáticos. En una realización, el término "metástasis" de acuerdo con la enseñanza se refiere a metástasis de nódulos linfáticos.

- 20 Una recaída o recurrencia sucede cuando una persona se ve afectada nuevamente por una condición que la afectó en el pasado. Por ejemplo, si un paciente ha sufrido una enfermedad tumoral, ha recibido un tratamiento exitoso para dicha enfermedad y nuevamente desarrolla dicha enfermedad, dicha enfermedad recientemente desarrollada puede considerarse una recaída o recurrencia. Sin embargo, de acuerdo con la enseñanza, una recaída o recurrencia de una enfermedad tumoral puede, pero no necesariamente, ocurrir en el sitio de la enfermedad tumoral original. Así, por ejemplo, si una paciente ha sufrido un tumor ovárico y ha recibido un tratamiento exitoso, una recaída o recurrencia puede ser la aparición de un tumor ovárico o la aparición de un tumor en un sitio diferente al ovario. Una recaída o recurrencia de un tumor también incluye situaciones en las que un tumor se produce en un sitio diferente al sitio del tumor original, así como en el sitio del tumor original. Preferiblemente, el tumor original para el que el paciente ha recibido un tratamiento es un tumor primario y el tumor en un sitio diferente al sitio del tumor original es un tumor secundario o metastásico.

- 30 Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse mediante la presente enseñanza son causadas por agentes infecciosos que incluyen, pero no se limitan a, virus, bacterias, hongos, protozoos, helmintos y parásitos.

- 35 Los virus infecciosos de vertebrados tanto humanos como no humanos, incluyen retrovirus, virus de ARN y virus de ADN. Los ejemplos de virus que se han encontrado en humanos incluyen, entre otros: *Retroviridae* (por ejemplo, Virus de inmunodeficiencia humana, como VIH-1 (también conocido como HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III); y otros aislados, como VIH-LP; *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus Coxsackie humanos, rinovirus, echovirus); *Calciviridae* (por ejemplo, cepas que cautilizan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); *Flaviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus del ébola); *Paramixoviridae* (por ejemplo, virus de la parainfluenza, virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la influenza); *Bungaviridae* (por ejemplo, virus de Hanta, virus de bunga, flebovirus y virus de Nairo); *Arena viridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbiviruses y rotavirus); *Bimaviridae*; *Hepadna-viridae* (virus de la hepatitis B); *Parvovirida* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del papiloma, virus del polioma); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (virus herpes simplex (VHS) 1 y 2, virus de la varicela zoster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes; *Poxyviridae* (virus de variola, virus de vaccinia, virus de la viruela); e *Iridoviridae* (por ejemplo, virus de la peste porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de las encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no A, no B (clase 1 = transmitida internamente; clase 2 = parenteralmente transmitida (es decir, hepatitis C); Norwalk y virus relacionados, y astrovirus).

- 50 Los retrovirus que se contemplan incluyen tanto retrovirus simples como retrovirus complejos. Los retrovirus complejos incluyen los subgrupos de lentivirus, virus de leucemia de células T y virus espumosos. Los lentivirus incluyen VIH-1, pero también incluyen VIH-2, SIV, virus Visna, virus de inmunodeficiencia felina (FIV) y virus de anemia infecciosa equina (VAIE). Los virus de la leucemia de células T incluyen VHTL-1, VHTL-II, el virus de la leucemia de células T de simio (VCTS) y el virus de la leucemia bovina (VLB). Los virus espumosos incluyen el virus espumoso humano (VEH), el virus espumoso simio (VES) y el virus espumoso bovino (VEB).

- 55 Las infecciones o enfermedades bacterianas que pueden tratarse o prevenirse mediante la presente enseñanza son causadas por bacterias que incluyen, pero no se limitan a, bacterias que tienen una etapa intracelular en su ciclo de vida, tales como micobacterias (por ejemplo, *Mycobacterias tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. leprae* o *M. africanum*), rickettsia, micoplasma, clamidia y legionella. Otros ejemplos de infecciones bacterianas contempladas incluyen, entre otras, infecciones causadas por bacilos gram-positivos (por ejemplo, *Listeria*, *Bacillus* como *Bacillus*

- 5 *anthracis*, especies de *Erysipelothrix*), bacilos gram-negativos (por ejemplo, *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Francisella*, *Hemophilus*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Vibrio* y *Yersinia*), bacterias espiroquetas (por ejemplo, especies de *Borrelia*, incluyendo *Borrelia burgdorferi* que causa la enfermedad de Lyme), bacterias anaerobias (por ejemplo, *Actinomyces* y especies de *Clostridium*), bacterias coccales gram-positivas y negativas, especies de *Enterococcus*, especies de *Streptococcus*, especies de *Pneumococcus*, especies de *Staphylococcus*, especies de *Neisseria*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, pero no se limitan a: *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Grupo A de Streptococcus),
- 10 *Streptococcus agalactiae* (Grupo B de Streptococcus), *Streptococcus viridans*, *Streptococcus aecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, y *Actinomyces israelii*.
- 15 Las enfermedades fúngicas que pueden tratarse o prevenirse mediante la presente enseñanza incluyen, pero no se limitan a, aspergilosis, criptococosis, esporocitosis, coccidioidomicosis, paracoccidioidomicosis, histoplasmosis, blastomicosis, cigomicosis y candidiasis.
- Las enfermedades parasitarias que pueden tratarse o prevenirse mediante la presente enseñanza incluyen, pero no se limitan a, amibiasis, malaria, leishmanía, coccidiosis, giardiasis, criptosporidiosis, toxoplasmosis y tripanosomiasis.
- 20 También se incluyen infecciones por varios gusos, como, pero no se limitan a, ascariasis, anquilostomiasis, tricuriasis, fuerte ilidiasis, toxocariasis, triquinosis, oncocercosis, filaria y dirofilariasis. También se incluyen las infecciones causadas por varios trematodos, como la esquistosomiasis, la paragonimiasis y la clonorchiasis, entre otras.
- 25 El término "tratamiento" o "tratamiento terapéutico" se refiere a cualquier tratamiento que mejora el estado de salud y/o prolonga (aumenta) la vida útil de un individuo. Dicho tratamiento puede eliminar la enfermedad en un individuo, detener o retrasar el desarrollo de una enfermedad en un individuo, inhibir o retrasar el desarrollo de una enfermedad en un individuo, disminuir la frecuencia o gravedad de los síntomas en un individuo y/o disminuir la recurrencia en un individuo que actualmente tiene o que previamente ha tenido una enfermedad.
- 30 Los términos "tratamiento profiláctico" o "tratamiento preventivo" se refieren a cualquier tratamiento destinado a prevenir el que ocurra una enfermedad en un individuo. Los términos "tratamiento profiláctico" o "tratamiento preventivo" se utilizan en la presente memoria de manera intercambiable.
- 35 Los términos "individuo" y "sujeto" se utilizan en la presente memoria de manera intercambiable. Se refieren a seres humanos, primates no humanos u otros mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, vacas, cerdos, ovejas, caballos o primates) que pueden estar afectados o son susceptibles a una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) pero que pueden o no tener la enfermedad o el trastorno. En muchas realizaciones, el individuo es un ser humano. A menos que se indique lo contrario, los términos "individuo" y "sujeto" no denotan una edad en particular, y por lo tanto abarcan adultos, ancianos, niños y recién nacidos. En realizaciones preferidas de la presente enseñanza, el "individuo" o "sujeto" es un "paciente". El término "paciente" significa, de acuerdo con la enseñanza, a un sujeto para tratamiento, en particular un sujeto enfermo.
- 40 Por "estar en riesgo" se entiende un sujeto, es decir, un paciente, que se identifica que tiene una probabilidad mayor de lo normal de desarrollar una enfermedad, en particular cáncer, en comparación con la población en general. Además, un sujeto que ha tenido, o que tiene actualmente, una enfermedad, en particular cáncer, es un sujeto que tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad, ya que dicho sujeto puede continuar desarrollando una enfermedad. Los sujetos que actualmente tienen o que han tenido un cáncer, también tienen un mayor riesgo de
- 45 cáncer metastásico.
- El término "inmunoterapia" se refiere a un tratamiento que implica una reacción o una respuesta inmunitaria específica.
- En el contexto de la presente enseñanza, los términos como "proteger", "prevenir", "profiláctico", "preventivo" o "pro-correctivo" se refieren a la prevención o el tratamiento, o ambos, de la aparición y/o propagación de una enfermedad en un sujeto y, en particular, para minimizar la posibilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad o retrasar el
- 50 desarrollo de una enfermedad. por ejemplo, una persona en riesgo de un tumor, como se describió anteriormente, sería un candidato para la terapia para prevenir un tumor.
- 55 Una administración profiláctica de una inmunoterapia, por ejemplo, una administración profiláctica de un agente o una composición de la enseñanza protege preferiblemente al receptor del desarrollo de una enfermedad. Una administración terapéutica de una inmunoterapia, por ejemplo, una administración terapéutica de un agente o composición de la enseñanza puede conducir a la inhibición del progreso/crecimiento de la enfermedad. Esto comprende la desaceleración del progreso/crecimiento de la enfermedad, en particular una interrupción de la progresión de la enfermedad, que preferiblemente conduce a la eliminación de la enfermedad.

La inmunoterapia se puede realizar utilizando cualquiera de una variedad de técnicas, en las que los agentes proporcionados en la presente memoria funcionan preferiblemente para eliminar células que expresan un antígeno de un paciente. Tal eliminación puede tener lugar como resultado de potenciar o inducir una respuesta inmune en un paciente específico para un antígeno o un antígeno que expresan las células.

- 5 El término "inmunización" o "vacunación" describe el proceso de tratamiento de un sujeto con el propósito de inducir una respuesta inmune por razones terapéuticas o profilácticas.

El término "*in vivo*" se refiere a la situación en un sujeto.

- 10 Los receptores de antígeno, cadenas peptídicas, ácidos nucleicos, células recombinantes, células efectoras inmunes, preferiblemente las células T de la enseñanza, así como otros compuestos y agentes descritos en la presente memoria pueden administrarse en forma de cualquier composición farmacéutica adecuada.

Las composiciones farmacéuticas de la enseñanza son preferiblemente estériles y contienen una cantidad efectiva de los agentes descritos en la presente memoria y opcionalmente de agentes adicionales como se discute en la presente memoria para generar la reacción deseada o el efecto deseado.

- 15 Las composiciones farmacéuticas generalmente se proporcionan en una forma de dosificación uniforme y se pueden preparar de una manera conocida *per se*. Una composición farmacéutica puede, por ejemplo, estar en forma de solución o suspensión.

- 20 Una composición farmacéutica puede comprender sales, sustancias tampón, conservadores, portadores, diluyentes y/o excipientes, todos los cuales son preferiblemente farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a la no toxicidad de un material que no interacciona con la acción del componente activo de la composición farmacéutica.

- 25 Las sales que no son farmacéuticamente aceptables pueden utilizarse para preparar sales farmacéuticamente aceptables y se incluyen en la enseñanza. Las sales farmacéuticamente aceptables de este tipo comprenden de manera no limitativa a las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables también se pueden preparar como sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de sodio, sales de potasio o sales de calcio.

Las sustancias tampón adecuadas para utilizar en una composición farmacéutica incluyen ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal.

- 30 Los conservadores adecuados para utilizar en una composición farmacéutica incluyen cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabeno y timerosal.

Una formulación inyectable puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como Lactato de Ringer.

- 35 El término "portador" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de naturaleza sintética o natural, en el que el componente activo se combina para facilitar, mejorar o habilitar la aplicación. De acuerdo con la enseñanza, el término "portador" también incluye uno o más rellenos sólidos o líquidos compatibles, sustancias diluyentes o encapsulantes, que son adecuados para la administración a un paciente.

Las posibles sustancias portadoras para administración parenteral son, por ejemplo, agua estéril, Ringer, lactato de Ringer, solución de cloruro de sodio estéril, polialquilenglicoles, naftalenos hidrogenados y, en particular, polímeros de lactida biocompatibles, copolímeros de lactida/glicólido o copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno.

- 40 El término "excipiente" cuando se utiliza en la presente memoria pretende indicar a todas las sustancias que pueden estar presentes en una composición farmacéutica y que no son ingredientes activos tales como, por ejemplo, portadores, aglutinantes, lubricantes, espesantes, agentes tensioactivos, conservadores, emulsionantes, tampones, agentes saborizantes o colorantes.

- 45 Los agentes y composiciones descritos en la presente memoria pueden administrarse a través de cualquier ruta convencional, tal como mediante administración parenteral, incluyendo inyección o infusión. La administración es preferiblemente parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica o intramuscular.

Las composiciones adecuadas para administración parenteral usualmente comprenden una preparación estéril acuosa o no acuosa del compuesto activo, que es preferiblemente isotónica para la sangre del receptor. Ejemplos de portadores y solventes compatibles son la solución de Ringer y una solución isotónica de cloruro de sodio. Además, generalmente se utilizan aceites fijos estériles como solución o como medio de suspensión.

- 50 Los agentes y composiciones descritos en la presente memoria se administran en cantidades efectivas. Una "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad que logra una reacción deseada o un efecto deseado solo o en conjunto con dosis adicionales. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular o de una afección particular, la reacción deseada se refiere preferiblemente a la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende ralentizar el progreso de la

enfermedad y, en particular, interrumpir o revertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad o de una afección también puede ser la demora del inicio o la prevención de la aparición de dicha enfermedad o afección.

5 La cantidad efectiva de un agente o composición descrita en la presente memoria dependerá de la afección a tratar, la severidad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, incluyendo la edad, afección fisiológica, estatura y peso, la duración del tratamiento, el tipo de terapia de acompañamiento (si está presente), la ruta específica de administración y factores similares. Por consiguiente, las dosis administradas de los agentes descritos en la presente memoria pueden depender de varios de tales parámetros. En el caso de que una reacción en un paciente sea insuficiente con una dosis inicial, se pueden utilizar dosis más altas (o efectivamente dosis más altas logradas por una ruta de administración diferente y más localizada).

10 Los agentes y composiciones descritos en la presente memoria pueden administrarse a pacientes, por ejemplo, *in vivo*, para tratar o prevenir una variedad de trastornos tales como los descritos en la presente memoria. Los pacientes preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos que pueden corregirse o mejorarse administrando los agentes y composiciones descritos en la presente memoria. Esto incluye trastornos que involucran células caracterizadas por la expresión de un antígeno.

15 Por ejemplo, en una realización, los agentes descritos en la presente memoria pueden utilizarse para tratar a un paciente con una enfermedad cancerígena, por ejemplo, una enfermedad cancerígena tal como se describe en la presente memoria, caracterizada por la presencia de células cancerígenas que expresan un antígeno.

20 Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento descritos de acuerdo con la enseñanza también se pueden utilizar para la inmunización o vacunación para prevenir una enfermedad descrita en la presente memoria.

25 La composición farmacéutica de la enseñanza se puede administrar junto con sustancias complementarias potenciadoras de la inmunidad tales como uno o más adyuvantes y puede comprender una o más sustancias potenciadoras de la inmunidad para aumentar aún más su eficacia, preferiblemente para lograr un efecto sinérgico de la inmunoestimulación. El término "adyuvante" se refiere a compuestos que prolongan o mejoran o aceleran una respuesta inmune. Varios mecanismos son posibles a este respecto, dependiendo de los diversos tipos de adyuvantes. Por ejemplo, compuestos que permiten la maduración de la DC, por ejemplo, lipopolisacáridos o ligando CD40, forman una primera clase de adyuvantes adecuados. Generalmente, cualquier agente que influya en el sistema inmune del tipo de "señal de peligro" (LPS, GP96, ARNdc, etc.) o citocinas, como GM-CSF, se puede utilizar como un adyuvante que permite intensificar una respuesta inmune y/o influenciar de manera controlada. Los oligodesoxinucleótidos CpG también se pueden utilizar opcionalmente en este contexto, aunque se deben considerar sus efectos secundarios que ocurren bajo ciertas circunstancias, como se explicó anteriormente. Los adyuvantes particularmente preferidos son las citocinas, tales como las monocinas, linfocinas, interleucinas o quimiocinas, por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , GM-LCR, LT- $\alpha$  o factores de crecimiento, por ejemplo, hGH. Otros adyuvantes conocidos son hidróxido de aluminio, adyuvante de Freund o aceite como Montanide®, más preferible el Montanide® ISA5. Los lipopéptidos, tales como Pam3Cys, también son adecuados para su uso como adyuvantes en la composición farmacéutica de la presente enseñanza.

30 La composición farmacéutica se puede administrar localmente o sistémicamente, preferiblemente sistémicamente.

35 El término "administración sistémica" se refiere a la administración de un agente de tal manera que el agente se convierte en ampliamente distribuido en el cuerpo de un individuo en cantidades significativas y desarrolla un efecto deseado. Por ejemplo, el agente puede desarrollar el efecto deseado en la sangre y/o alcanzar su sitio de acción deseado a través del sistema vascular. Las rutas de administración sistémicas típicas incluyen la administración mediante la introducción del agente directamente en el sistema vascular o la administración oral, pulmonar o intramuscular en la que el agente se adsorbe, ingresa al sistema vascular y se transporta a uno o más sitios de acción deseados a través de la sangre.

40 De acuerdo con la presente enseñanza, se prefiere que la administración sistémica sea por administración parenteral. El término "administración parenteral" se refiere a la administración de un agente de manera que el agente no pase al intestino. El término "administración parenteral" incluye la administración intravenosa, la administración subcutánea, la administración intradérmica o la administración intraarterial, pero no se limita a las mismas.

45 La administración también se puede llevar a cabo, por ejemplo, por vía oral, intraperitoneal o intramuscular.

50 Los agentes y composiciones proporcionados en la presente memoria pueden utilizarse solos o en combinación con regímenes terapéuticos convencionales tales como cirugía, irradiación, quimioterapia y/o trasplante de médula ósea (autólogo, singénico, alogénico o no relacionado).

55 La presente enseñanza se describe en detalle por las figuras y ejemplos que se muestran a continuación, se utilizan solo con fines ilustrativos y no tienen el propósito de ser limitantes. Debido a la descripción y los ejemplos, otras formas de realización que también se incluyen en la enseñanza son accesibles para el experto en la materia.

Figuras

La Figura 1 contiene una representación del complejo RCT-CD3. Las subunidades RCT y CD3 están compuestas de ectodominios, una región de tallo, un dominio transmembranal y dominios citosólicos que llevan los IABT. La expresión del co-receptor CD4 o CD8 determina el compromiso con los subconjuntos de células T CD4+ o CD8+. Los motivos de activación intracitoplasmáticos de inmunorreceptores de CD3 basados en tirosina (IABT) se indican como cilindros (adaptado del "The T cell receptor facts book", MP Lefranc, G Lefranc, 2001).

La Figura 2 muestra el diseño de generaciones sucesivas de RAQs. Representación esquemática de las diferentes generaciones de RAQs (1G, primera generación, 2G, segunda generación, 3G, tercera generación). La primera generación contiene Fvcs extracelular y la cadena citoplasmática CD3ζ/ZAP70 que media la función efectora inmediata como la secreción de IFNγ o la citotoxicidad, la segunda generación adicionalmente CD28/PI3K promoviendo la proliferación y la tercera generación además 4-1BB u OX40/TRAF sosteniendo la supervivencia celular (Casucci, M. et al. (2011) 2:378-382).

La Figura 3 contiene una representación esquemática de los diferentes formatos de receptor para la redirección de las células T contra un antígeno. Ca/β son los dominios constantes de un RCT que también funcionan como un dominio de transmisión de señal al transmitir la señal de un antígeno unido a través de la membrana celular a los dominios de señalización del complejo CD3 reclutado en el citoplasma; VP y VL son las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de una inmunoglobulina, respectivamente, y que son representativas de los dominios en las dos cadenas peptídicas que forman un sitio de unión al antígeno. Izquierda: un RAQ de segunda generación que consiste en un fragmento Fvcs específico de antígeno, un dominio espaciador derivado de IgG1, un co-estimulador CD28 y un dominio de señalización CD3ζ (RAQ clásico de cadena sencilla); centro: un formato RAQ novedoso basado en el enlace del Fvcs con el dominio constante de la cadena RCTβ murina y la co-expresión del dominio constante de la cadena RCTα murina (receptor de antígeno monovalente no combinatorio); derecha: un RCT murino compuesto por cadenas α/β RCT (mu, murino). El heterodímero CD3δε y el homodímero CD3ζζ son reclutados por el dominio Ca mientras que CD3γε es reclutado por el dominio Cβ.

Las Figuras 4A y B muestran las estructuras de algunos de los receptores de antígeno descritos en la presente memoria. La nomenclatura de los dominios es como se describe en la leyenda de la figura 3. Un receptor de antígeno en tándem (RA en tándem) comprende una cadena que comprende 4 fragmentos de anticuerpos variables que forman 2 sitios de unión al antígeno. Un RA intra/inter-combinatorio es capaz de unirse intra e inter-cadena a los antígenos. Un RA inter-combinatorio permite la unión de antígenos exclusivamente a través de la unión inter-cadenas. El RA no combinatorio monovalente representa el prototipo monovalente del nuevo diseño del RA basado en el reclutamiento de CD3 endógeno, el RA no combinatorio bivalente es un RAQ, cuyo diseño ya ha sido sugerido por Gross et al., 1992 FASEB J.,(6) 3370-3378 y confina la unión a cada antígeno a una sola cadena. El RA combinatorio monovalente sirve como un RA de referencia o un control negativo para demostrar el beneficio en la función al proporcionar valencias más altas por medio de fragmentos Fvcs en el diseño de RAQ.

La Figura 5 es un histograma que muestra los niveles de expresión relativa de los receptores de antígeno en las células T. La expresión en células T electroporadas de ARN de RAQ se ha validado en análisis de citometría de flujo aprovechando un anticuerpo idiotípico dirigido contra el paratopo del anticuerpo específico de Claudina 6 IMAB206. El anticuerpo de citometría de flujo se marcó directamente con Dylight-640, los niveles de expresión se dan en intensidades de fluorescencia medias (IFM).

Las figuras 6A a 6C son histogramas que muestran los niveles relativos inducidos de producción de IFN-γ, que es un indicador de la activación de las células inmunes. Figura 6A: Detección de la producción de IFN-γ en ELISA para células T CD8+ electroporadas con diferentes construcciones y controles y co-cultivadas con células dendríticas inmaduras positivas y negativas C16 (CDi). Los receptores de antígeno bivalentes capaces de unirse al antígeno inter-cadenas mostraron una buena producción de IFN-γ (RA 2GS, 3GS, 4GS inter-combinatorias). La variación de la longitud del enlazador entre los dominios variables no tuvo un impacto significativo en la función del receptor, pero el enlazador 3GS pareció ser mejor en comparación con el enlazador 2 y 4GS. El truncamiento de los dominios N-terminales variables del receptor del antígeno bivalente para obtener un receptor de antígeno monovalente (RA combinatorio monovalente) redujo drásticamente la función del receptor, demostrando la importancia de la unión del antígeno bivalente para la función del receptor superior. Los dominios constantes murinos en la estructura del receptor del antígeno conducen a una producción ligeramente mejorada de IFN-γ (AR Mu 3GS inter-combinatorio). Figura 6B: Un experimento replicado del descrito en la Figura 6A que muestra resultados similares, pero con células T obtenidas de un donante diferente para demostrar la independencia del donante de los resultados. Figura 6C: Esencialmente, una repetición de los experimentos divulgados en las Figuras 6A y 6B. El receptor de antígeno en tándem y el receptor de antígeno intra/inter-combinatorio (que permite el reconocimiento de antígeno a través de la combinación de los dominios VP/VL intra/inter-cadenas), conducen a una mayor inducción de la expresión de IFN-γ en comparación con el receptor de antígeno monovalente (RA no combinatorio monovalente) y en comparación con un receptor de antígeno que tiene solo unión al antígeno intra-cadena (RA no combinatorio bivalente).

La Figura 7 es un histograma que muestra la eficacia citotóxica de las células T modificadas con RAQ C16 hacia las células de carcinoma de ovario Sk-ov-3. Las células tumorales se han electroporado con cantidades crecientes de ARN C16, las células T CD8+ se han electroporado con diferentes construcciones de expresión del receptor de antígeno. La función efectora de las células T medida por la lisis celular disminuyó con cantidades decrecientes de C16 expresadas en las células Sk-ov-3. La citotoxicidad de las células T que expresan de manera recombinante a los

receptores de antígeno bivalente (RA en tándem y RA inter-combinatorios) fue menos dependiente de la densidad del antígeno en las células diana en comparación con el receptor de antígeno no combinatorio monovalente y el RAQcs clásico.

5 Las Figuras 8A-8D son histogramas que muestran los resultados de la activación de las células inmunes según lo determinado por la proliferación celular contra CDi como CPA. Figuras 8A y 8B: Proliferación de células T CD4+ marcadas con CFSE (Figura 8A) y CD8+ (Figura 8B), respectivamente, contra células dendríticas inmaduras negativas (CDi) Cl6. Tras la co-estimulación con las moléculas CD80 y 41BBL en cis (es decir, electroporación en células T), el receptor de antígeno quimérico de cadena sencilla clásico (RAQcs clásico) reveló la proliferación de fondo en ausencia de su antígeno cognado. Esto también se observó para las células T incubadas sin células diana, lo que indica que la proliferación no específica es una característica intrínseca de las células T que expresan al RAQcs clásico (datos no mostrados). Este resultado también se observó con la línea celular negativa Cl6 Sk-Ov-3. Figuras 8C y 8D: Proliferación de células T CD4+ marcadas con CFSE (Figura 8C) y CD8+ (Figura 8D), respectivamente, frente a CDi Cl6 +. Las células T CD4+ proliferaron contra los CDi cargados con Cl6 cuando se electroporaron con una construcción que expresaba al RA inter-combinatorio. El diseño clásico de RAQcs condujo a una menor proliferación. Para las células T CD8+, tanto el RAQcs clásico como el RA inter-combinatorio mostraron casi la misma buena proliferación.

10 Las Figuras 9A-9B son histogramas que muestran los resultados de la activación de las células inmunes según lo determinado por la proliferación celular contra las células tumorales como CPA. La proliferación de células T CD4+ marcadas con CFSE (Figura 9A) y CD8+ (Figura 9B) contra la línea celular de carcinoma de ovario Cl6+ Ov-90 electroporada con moléculas coestimuladoras CD80 y 41BBL (co-estimulación en trans). Las células T CD4+ fueron capaces de proliferar contra Ov-90<sup>Cl6+CD80+41BBL+</sup> cuando se electroporaron con el RA inter-combinatorio en analogía con CDi<sup>Cl6+</sup>. Los receptores de antígeno monovalente y bivalente condujeron a la proliferación de células T CD8+. La cantidad de proliferación fue comparable con el clásico RAQcs. La co-estimulación de células T en cis aumentó aún más la proliferación de las células T.

15 La Figura 10 es un histograma que muestra la inducción dependiente de la dosis del antígeno de la producción de IFN- $\gamma$ . La detección de la producción de IFN- $\gamma$  en ELISA para células T CD8+ electroporadas con diferentes construcciones y controles de expresión del receptor de antígeno, y co-cultivadas con células dendríticas inmaduras (CDi) electroporadas con ARN C16 de longitud completa relevante en el intervalo de 0.01  $\mu$ g - 1  $\mu$ g y 1  $\mu$ g de gp100 irrelevante. Los receptores de antígeno bivalentes se evaluaron para la secreción de citocinas dependiente de la cantidad hipotética de apareamiento de la cadena combinatoria con el orden RA inter-> inter/intra-> bivalente no combinatorio. A una alta densidad de antígeno (1  $\mu$ g de Cl6), el RAQ clásico provocó la mayor cantidad de secreción de IFN $\gamma$  seguido por RA inter e inter/intra combinatoria. El AR bivalente no combinatorio fue menos funcional que el monovalente. RA combinatorio y un RA no combinatorio monovalente. El RA bivalente no combinatorio se basa en el apareamiento de cadenas simplemente entre los dominios C-terminales humanos invariables, mientras que el RA combinatorio monovalente logra un mejor apareamiento de cadenas entre los dominios C- de humanos y V- de ratón. El RA no combinatorio monovalente es más funcional que el RA no combinatorio bivalente debido al hecho de que el apareamiento entre cadenas es promovido por dominios C- de ratón en lugar de dominios humanos más débiles. Esto también es cierto para cualquier dosis de antígeno aplicada en este ensayo. En particular, cuando se reducen las densidades de antígeno (0.1  $\mu$ g, 0.01  $\mu$ g de células electroporadas con ARN Cl6), el AR inter-combinatorio se vuelve cada vez más reactivo frente a los CDi pulsados con ARN con antígeno relevante en comparación con el RAQ clásico. Esto está en línea con una tendencia similar mostrada en un ensayo de citotoxicidad dependiente de la dosis de antígeno (Figura 7) hacia una línea de células tumorales Skov-3 electroporadas con C16.

20 La Figura 11 es un histograma que muestra la inducción dependiente de la dosis de antígeno de la producción de IFN- $\gamma$ . En la Figura 11A, se muestra una comparación de los formatos de la combinatoria clásica y novedosa para RAQ clásicos. Ambas RAQs dependen de la señalización a través del resto de señalización CD3 $\zeta$  fusionado, independiente del complejo CD3 endógeno en las células T. La Figura 11B muestra la detección de la producción de IFN- $\gamma$  en ELISA para células T CD8+ electroporadas con RAQ específicos para Claudina 6 y el RAQ clásico combinatorio novedoso, ambos portadores de dominios de anticuerpos CH2-CH3 y CD28, y CD3 $\zeta$  como dominio de transmisión de señal. Se co-cultivaron con células dendríticas inmaduras (CDi) electroporadas con ARN C16 de longitud completa relevante en el intervalo de 0.002  $\mu$ g - 2  $\mu$ g y 2  $\mu$ g de gp100 irrelevante. A densidades de antígeno más altas (2  $\mu$ g - 0.2  $\mu$ g de Cl6) ambos formatos de RAQ produjeron cantidades iguales de secreción de IFN $\gamma$ . Para densidades de antígeno más bajas, el RAQ clásico parecía ser algo más eficiente en la secreción de IFN $\gamma$ . Es importante destacar que el RAQ clásico combinatorio es funcional en el mismo intervalo de antígeno titulado que el RAQ clásico.

#### Ejemplos

25 Las técnicas y métodos utilizados en la presente memoria se describen en la presente o se llevan a cabo de una manera conocida *per se* y como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Todos los métodos, incluyendo el uso de kits y reactivos, se llevan a cabo de acuerdo con la información del fabricante, a menos que se indique específicamente.

Ejemplo 1: Expresión de receptores de antígeno en células T

La expresión de diversas construcciones de receptor de antígeno se evaluó un día después de la electroporación en células T CD8+ utilizando un anticuerpo específico de idiotipo Fvcs Cl6. Las construcciones o combinación de las construcciones probadas para la expresión fueron (i) el dominio constante de la cadena alfa del receptor de células T murinas solo (mCa); (ii) solamente VP-VL-mCβ (Fvcs-mCβ); (iii) VP-VL-CH2-CH3-CD28-CD3ζ (RAQcs clásico); (iv) mCa y VP-VL-mCβ (RA no combinatorio monovalente); (v) VP-VL-mCa y VP-VL-mCβ (RA bivalente no combinatorio); (vi) VL-VP-mCa y VP-VL-mCβ (RA intra/inter combinatorio); (vii) mCa y VP-VL-VP-VL-mCβ (RA en tándem); (viii) VP-hCa y VL-hCβ (AR combinatorio monovalente); (ix) VP-(GGGGS)3-VP-hCa y VL-(GGGGS)3-VL-hCβ (RA 3GS inter-combinatorio); y (x) VP-(GGGGS)3-VP-mCa y VL-(GGGGS)3-VL-mCβ (RA inter-combinatorio Mu 3GS) ("m" o "Mu" indica origen murino y "h" indica origen humano del dominio constante). Estas diferentes construcciones de receptor de antígeno se presentan esquemáticamente en las Figuras 4A-4B. Los datos en la Figura 5 representan los resultados de dos mediciones separadas para los receptores de antígeno combinatorio para los receptores de antígeno bivalente no combinatorio y los receptores intra/inter-combinatorio monovalente; cinco mediciones para el tándem y los receptores de antígeno inter-combinatorios; y hasta diez mediciones para el RAQcs clásico y los receptores de antígeno no combinatorios monovalentes. El valor de MFI de cada muestra se normalizó al control negativo correspondiente (mCa o Fvcs-mCβ establecido a 1).

Como se muestra en la Figura 5, el diseño clásico de RAQcs mostró la mejor expresión. Los receptores de antígenos monovalentes no combinatorios, bivalentes no combinatorios, intra/inter-combinatorios e inter-combinatorios con dominios constantes humanos (Ch) o murinos (Cm) mostraron una expresión similar.

El RA combinatorio monovalente mostró una tinción superficial reducida, mientras que el receptor de antígeno en tándem mostró una tinción superficial incrementada, en comparación con las otras construcciones, excepto con el RAQcs clásico.

#### Ejemplo 2: Ensayo de secreción de IFN-γ

En el día 1 del experimento, se aislaron células mononucleares de sangre periférica ("CMSPs") de una capa leucocítica de un donante sano. A partir  $\frac{3}{4}$  de las CMSP, las células CD14+ se aislaron utilizando la clasificación MACS. El flujo de MACS y las CMSP residuales se clasificaron por MACS para células T CD8+. Las células CD14+ se diferenciaron hacia células dendríticas inmaduras ("CDi") mediante la administración de IL-4 y GM-CSF (1000U/ml) el día 1, 3, 6. Las células T CD8+ se transfirieron en placas de 6 pocillos recubiertas con OKT3. El día 3, las células T se transfirieron a nuevas placas de 6 pocillos. El día 7, los CDi se electroporaron con ARN irrelevante y ARN Cl6 IVT. Las células T activadas con OKT3 se electroporaron posteriormente con controles, o construcciones de receptor de antígeno como se establece en las figuras individuales y como se describe en el Ejemplo 1. Para garantizar la calidad, se analizó la expresión de la superficie del receptor de antígeno en células T utilizando un anticuerpo específico de idiotipo receptor de antígeno Cl6 marcado con Dylight 650 en el día 8. Las células T electroporadas y los CDi electroporados con antígeno se cultivaron posteriormente en una placa de 96 pocillos durante 20 h a una relación E:T de 10:1 por duplicado. El día 9, se tomaron los sobrenadantes de los cultivos y se analizaron para determinar la cantidad de IFN-γ secretada en un ELISA en sándwich utilizando el IFN-γ Ready Set Go! kit de eBioscience (#88-7316-88). Se detectó la absorbancia utilizando un lector de ELISA Tecan Sunrise.

Como se representa en la Figura 6A, las células T electroporadas simuladas (mCa) en cultivo con CDi positivas o negativas para Cl6 no mostraron producción de IFN-γ no específica. De las células T positivas para el receptor de antígeno, solo las células positivas para RAQcs clásicas produjeron un fondo detectable de la citoquina cuando se cultivaron con células diana negativas para Cl6. La producción de IFN-γ a partir de células positivas para el receptor de antígeno monovalente se pudo observar cuando se cultivaba con CDi Cl6+. Aquí, el RAQcs clásico produce grandes cantidades de IFN-γ. Cuando se electroporaron con un control negativo de solamente una cadena del receptor de antígeno combinatorio, en este caso VP-VP-Cα, no se pudo observar producción de IFN-γ. Este control demostró que ambas cadenas son necesarias para el reconocimiento del antígeno y la activación posterior de las células T. Por el contrario, el RA inter-combinatorio (3GS) mostró una mejora pronunciada en la producción de IFN-γ en comparación con el producido con el RA monovalente (combinatorio y no combinatorio). Las diferentes longitudes del enlazador, 2 ó 4 repeticiones del enlazador Gly4Ser entre los dominios variables, no mostraron un impacto importante en la función, en comparación con las 3 repeticiones.

Es importante destacar que un truncamiento del dominio variable N-terminal en la estructura combinatoria del receptor del antígeno mostró una fuerte reducción en la función efectora. Esta observación demostró claramente que la unión al antígeno bivalente apoya la activación de las células T. El notable aumento de la función entre el RA combinatorio monovalente y el RA combinatorio bivalente también es una fuerte indicación de que, además de la mejora del apareamiento de cadenas mediado por los dominios variables inter-cadenas, la incidencia de la unión del antígeno a través de las dos cadenas estabiliza aún más el apareamiento de la cadena del receptor y, por lo tanto, mejora la incorporación en el complejo CD3 endógeno y la posterior activación/función de las células T. A partir de los receptores de células T de doble cadena, es bien sabido que la heterodimerización de las cadenas es un requisito previo esencial para la incorporación eficiente en el complejo CD3.

La integración de residuos murinos en la estructura combinatoria del RA fue capaz de aumentar aún más la activación, lo que se cree que se debe a la interacción más fuerte conocida de los dominios Ca/β constantes de RCT murino en comparación con los humanos. Por lo tanto, la heterodimerización mejorada de las cadenas peptídicas del receptor

del antígeno, ya sea mediante la unión del antígeno inter-cadenas a los dominios variables o mediante la dimerización de los dominios constantes del receptor de células T en las cadenas individuales, la integración mejoró del receptor de antígeno en el complejo CD3 endógeno y, por lo tanto, mejoró la función de las células T. Estos resultados fueron altamente reproducibles con un donante de células T diferente (véase la Figura 6B).

5 Notablemente, el RAQcs clásico demostró en este experimento un trasfondo no específico de la producción de IFN- $\gamma$  contra CDi negativos a Cl6. Este resultado también es reproducible y está en línea con los datos publicados por Long et al. ((2015) Nat. Med., (21) 581-590) discutiendo la señalización tónica por el clásico formato de fusión RAQcs-CD28-CD3 $\zeta$ . Long et al. observaron una activación independiente al antígeno para varios RAQcs clásicos de especificidades de antígeno variables. Se asume que la activación de fondo no específica de las células T positivas RAQcs clásicas no es un efecto específico del donante de células T.

Además, y como se representa en la Figura 6C, los receptores de antígeno bivalente no combinatorios e intra/inter combinatorios se probaron junto con el receptor de antígeno bivalente en tándem para la producción de IFN- $\gamma$ . En comparación, el control negativo, el RA monovalente no combinatorio y, como control positivo, el RAQcs clásico también se muestran en la figura. El receptor de antígeno bivalente en tándem mostró una mejora en comparación con el receptor de antígeno monovalente. El receptor de antígeno bivalente no combinatorio VP-VL-C $\alpha$  + VP-VL-C $\beta$  provocó una menor producción de IFN- $\gamma$  en comparación con el receptor de antígeno intra/inter-combinatorio relacionado VL-VP-C $\alpha$  + VP-VL-C $\beta$ . Estas observaciones confirmaron la hipótesis de que las interacciones inter-cadenas conferidas tanto por el apareamiento de dominios V como por la unión de antígenos a dominios variables en diferentes cadenas estabilizan la topología heterodimérica y proporcionan una respuesta de señalización de células T dependiente del receptor más robusta.

#### Ejemplo 3: Ensayo de citotoxicidad

En el día 1 del experimento, se aislaron CMSPs frescas de dos capas leucocíticas de dos donantes sanos. Las CMSPs se clasificaron en MACS para células T CD8+. Las células T CD8+ se transfirieron en placas de 6 pocillos recubiertas con OKT3. Se cultivaron en medio que contenía 50 U/ml de IL-2. El día 3, las células T se transfirieron a nuevas placas de 6 pocillos y se cambió el medio de cultivo. El día 7, la línea celular de carcinoma de ovario Sk-Ov-3 se sometió a electroporación de ARN con cantidades variables de ARN Cl6 y 10  $\mu$ g de ARN de luciferasa. Las células T activadas con OKT3 se electroporaron con un RAQcs clásico irrelevante, un RAQcs clásico específico de Cl6 relevante, un receptor de antígeno no combinatorio monovalente y un receptor de antígeno en tándem, así como un receptor de antígeno inter-combinatorio de la enseñanza como se indica en la Figura 7 y como se describió anteriormente en el Ejemplo 1. Para garantizar la calidad, se analizó la expresión de la superficie del receptor de antígeno en células T utilizando un anticuerpo específico de idiotipo del receptor de antígeno Cl6 marcado con Dylight 650 en el día 8. Las células T electroporadas con receptor de antígeno y la línea celular Sk-Ov-3 electroporada con antígeno, fueron co-cultivadas en una placa de 96 pocillos durante 3 horas a una relación E:T de 30:1 por triplicado. Después de 3 horas de incubación, se añadió luciferina a cada cultivo. La lisis específica se detectó por una disminución en la señal de luciferina debido a su renovación por la luciferasa liberada en el lector TECAN.

Los datos de Sk-Ov-3 documentan de manera impresionante que los receptores de antígenos bivalentes (RA inter-combinatorios y RA en tándem) de la enseñanza mostraron una mejora notable en comparación con el RAQcs clásico y el RA no combinatorio monovalente. En comparación con todas las otras construcciones de receptores de antígeno, el diseño clásico de RAQcs mostró la mejor lisis de aproximadamente el 77% contra las células Sk-Ov-3 electroporadas con Cl6. Sin embargo, debe mencionarse que 10  $\mu$ g de antígeno de ARN es una condición no fisiológica y no refleja con precisión la situación *in vivo*. A dosis bajas de antígeno, el RA no combinado monovalente no pudo lisar a las células tumorales de manera satisfactoria (9.2%). Por el contrario, el RA inter-combinatorio (3GS) todavía mostró una buena lisis específica (41.3%) en comparación con el diseño clásico de RAQcs (48.1%) y, de manera concluyente, fue menos dependiente de la densidad del antígeno para una función efectora citotóxica sustancial.

#### Ejemplo 4: Ensayo de proliferación

En el día 1 del experimento, se aislaron CMSsP frescas de una capa leucocitaria de un donante sano. De 3/4 de las CMSPs, las células CD14+ se aislaron utilizando la clasificación MACS, y las CMSPs residuales se congelaron. Las células CD14+ se diferenciaron en CDi mediante la administración de IL-4 y GM-CSF (1000U/ml) los días 1, 3, 6. En el día 7, las CDi se electroporaron con ARN-IVT irrelevante y Cl6. Las CMSPs congeladas se descongelaron el mismo día y se clasificaron mediante MACS para células CD4+ y CD8+. Sin ninguna activación previa (OKT3), las células T nativas, 6 y 7x10<sup>6</sup> células, respectivamente, se electroporaron posteriormente con controles, construcciones de receptor de antígeno clásico, monovalente y bivalente como se indica en las Figuras 8A-8D, cuyas construcciones se describieron en el Ejemplo 1. En un conjunto independiente de respondedores de células T, las mismas construcciones de receptor de antígeno también se electroporaron junto con las moléculas co-estimuladoras 41BBL y CD80 para lograr una auto-co-estimulación o una co-estimulación en cis, que se demostró que mejora la función efectora.

Para garantizar la calidad, se analizó la expresión del receptor de antígeno y 41BBL + D80 en células T mediante tinción con FACS el día 8. Las células T se marcaron posteriormente con el marcador de proliferación CFSE. Las células T electroporadas y las CDi, así como la línea celular de carcinoma de ovario OV-90, se cultivaron

posteriormente en una placa de 96 pocillos durante 5 días a una proporción E:T de 10:1 por duplicado. En el día 5, las células cultivadas se tiñeron en las placas de 96 pocillos con anticuerpos CD4 o CD8 marcados con CPA-Cy7. La proliferación de células T se detectó mediante FACS mediante la reducción de la señal de CFSE debido a la dilución en células hijas en proliferación. Con ajustes menores, los tamaños de las poblaciones hijas se evaluaron utilizando la herramienta de proliferación implementada en Flowjo. La suma de las células en proliferación se representa como generaciones hijas.

Se evaluó la proliferación de fondo de células T para células cultivadas con la línea celular negativa de Cl6 Sk-Ov-3 y las CDi negativas de Cl6. Independientemente de la construcción del receptor de antígeno electroporado, ni las células T CD4+ ni CD8+ proliferaron contra las células Cl6 negativas. Tras la co-estimulación en cis, solamente las células T de ingeniería de RAQcs clásicas proliferaron de forma no específica frente a CDi negativas a C16 y Sk-Ov-3 (datos de Sk-Ov-3 no mostrados). Las células T CD4+ proliferaron en general de manera menos eficiente contra las células Cl6+ en comparación con las células T CD8+ (véase las Figuras 8C a 8D). Esto era particularmente cierto cuando se utilizaban células tumorales Cl6+ Ov-90 como células diana (Figuras 9A a 9B).

Los resultados para las células T co-cultivadas con CDi demostraron la buena función general del receptor de antígeno inter-combinatorio. De las células T CD4+ sin co-estimulación en cis, el receptor de antígeno combinatorio mostró una proliferación superior e incluso superó el diseño clásico de RAQcs. Este efecto no se debió a una expresión superficial reducida del RAQcs clásico, como se analizó mediante tinción con idiotipo de RAQ. Para las células T CD8+, el diseño del receptor de antígeno inter-combinatorio demostró una notable proliferación contra los CDi cargados con C16 (70%). La co-estimulación de las células T en cis podría mejorar aún más las respuestas de las células T.

Interesantemente, no se pudo observar proliferación de células contra la línea celular de carcinoma de ovario C16+ OV-90 (datos no mostrados). Esto se debió a la falta de moléculas co-estimuladoras en la superficie de las células tumorales. Para compensar esta falta de co-estimulo, las células Ov-90 se electroporaron con ARN CD80 y 41BBL. En este caso, se pudo detectar la proliferación de células T CD4+ y CD8+ (véase las Figuras 9A y 9B). En particular, para las células CD4+, este fue solo el caso del diseño de RA combinatorio (15%). Para las células CD8+, el patrón de proliferación parecía diferente. Las respuestas monovalentes para el RA no combinatorio, RAQcs clásica y RA combinatorio fueron comparables con el 60% de células proliferantes. Tras la co-estimulación en cis, se mejoró la proliferación, en particular, de las células T CD4+.

Los datos indican claramente que la construcción del receptor de antígeno bivalente (RA inter-combinatorio) es capaz de proliferar contra las líneas celulares tumorales Cl6+, cuando se co-estimula. En general, el RA inter-combinatorio es mucho mejor que el RA no combinatorio monovalente en la proliferación contra las CDi cargadas con el antígeno diana afin. El RAQcs clásico es propenso a respuestas inespecíficas cuando se co-estimula en cis contra CDi negativos para Cl6, lo que indica una mayor susceptibilidad a la señalización de células T, esto independiente del antígeno.

#### Ejemplo 5: ensayo de secreción de IFN $\gamma$ -titulado con antígeno

En el día 1 del experimento, se aislaron células mononucleares de sangre periférica ("CMSPs") de una capa leucocítica de un donante sano. A partir de 3/4 de las CMSPs, las células CD14+ se aislaron utilizando la clasificación MACS. El flujo de MACS y las CMSPs residuales se clasificaron por MACS para células T CD8+. Las células CD14+ se diferenciaron hacia células dendríticas inmaduras ("CDi") mediante la administración de IL-4 y GM-CSF (1000U/ml) en el día 1, 3, 6. Las células T CD8+ se transfirieron en placas de 6 pocillos recubiertas con OKT3. El día 3, las células T se transfirieron a nuevas placas de 6 pocillos. El día 7, las CDi se electroporaron con ARN de CIT IVT irrelevante y dependiente de la dosis. Las células T activadas con OKT3 se electroporaron posteriormente con controles, o con construcciones de receptor de antígeno como se establece en las figuras individuales y como se describe en el Ejemplo 1. Para garantizar la calidad, se analizó la expresión de la superficie del receptor de antígeno en células T utilizando un anticuerpo específico de idiotipo receptor de antígeno Cl6 marcado con Dylight 650 en el día 8. Las células T electroporadas y las CDi electroporadas con antígeno se cultivaron posteriormente en una placa de 96 pocillos durante 20 horas en una proporción E: T de 10:1 por duplicado. En el día 9, se tomaron los sobrenadantes de los cultivos y se analizaron para determinar la cantidad de IFN- $\gamma$  secretada en un ELISA en sándwich utilizando el IFN- $\gamma$  Ready Set Go! kit de eBioscience (#88-7316-88). Se detectó la absorbancia utilizando un lector de ELISA Tecan Sunrise. Los resultados se muestran en la Figura 10.

Los receptores de antígeno bivalentes se evaluaron para determinar la cantidad de secreción de citocinas dependiente de la propensión hipotética para aparearse de una forma combinatoria que favorezca la expresión estable y, posteriormente, la señalización de las células T: Nosotros especulamos para observar la combinación exclusiva, el apareamiento entre cadenas del dominio V para el RA inter-combinatorio, mientras que el RA inter/intra combinatorio puede coexistir en una proporción de apareamiento intra-cadena menos favorable. A una alta densidad de antígeno (1  $\mu$ g Cl6), el RAQ clásico provocó la mayor cantidad de secreción de IFN $\gamma$  seguido, como se esperaba, por RA inter- e intra-combinatorio. El RA no combinatorio bivalente fue menos funcional que las referencias de un RA combinatorio monovalente y un RA no combinatorio monovalente. El RA bivalente no combinatorio se basa en el apareamiento de cadenas simplemente entre los dominios C- humanos invariables, mientras que el RA combinatorio monovalente logra un mejor apareamiento de cadenas entre los dominios C- de humanos y los dominios V- de ratón. En línea con los resultados esperados, también el RA no combinatorio monovalente es más funcional que el RA no

combinatorio bivalente debido a el emparejamiento inter-cadenas, a pesar del hecho de que también está restringido a los dominios C- aquí, es promovido por los dominios C- de ratón en lugar de los humanos que son más débiles. Esto también es cierto para cualquier dosis de antígeno aplicada en este ensayo.

5 Notablemente, cuando se reducen las densidades de antígeno (0.1 µg, 0.01 µg de células electroporadas con ARN Cl6), el RA inter-combinatorio se vuelve cada vez más reactivo frente a los CDi pulsados con ARN relevante en comparación con el RAQ clásico. Esto está en línea con una tendencia similar mostrada en un ensayo de citotoxicidad dependiente de la dosis de antígeno (Figura 7) hacia una línea de células tumorales Skov-3 electroporadas con Cl6.

10 El RAQ clásico también se comparó con un RA clásico combinatorio novedoso en un ensayo de secreción de IFN $\gamma$  titulado con antígeno (Figura 11). Ambos receptores de antígeno quiméricos comprenden dominios de anticuerpos CH2-CH3 y CD28, y CD3 $\zeta$  como dominio de transmisión de señal. Se co-cultivaron con células dendríticas inmaduras (CDi) electroporadas con ARN de Cl6 de longitud completa relevante en el intervalo de 0.002 µg - 2 µg y 2 µg de gp100 irrelevante. A densidades de antígeno más altas (2 µg - 0.2 µg Cl6) ambos formatos del RAQ provocaron cantidades iguales de secreción de IFN $\gamma$ . Para densidades de antígeno más bajas, el RAQ clásico parecía ser aparentemente más eficiente en la secreción de IFN $\gamma$ . Es importante destacar que el RAQ clásico combinatorio es funcional en el mismo intervalo de antígeno titulado que el RAQ clásico hasta cantidades muy bajas de Claudina 6 expresada endógenamente. Sin embargo, este formato de un RA combinatorio, a diferencia del diseño combinatorio basado en RCT C $\alpha$ /C $\beta$  del RA, aparentemente conduce a una señalización de células T igual pero no mejor que el RAQ clásico, presumiblemente debido a una señalización exógena dependiente de CD3 $\zeta$  pero independiente de CD3 endógeno. Se supone que el primer mecanismo es independiente del reclutamiento endógeno de CD3 al RCT o al RAQ, 15 20 respectivamente, lo que a su vez regularía la cantidad de activación de las células T.

**REIVINDICACIONES**

1. Un receptor de antígeno, cuyo receptor comprende una primera cadena peptídica y una segunda cadena peptídica, en donde la primera cadena peptídica comprende al menos un primer y un segundo dominio, y un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora;
- 5 la segunda cadena peptídica comprende al menos un primer y un segundo dominio, y un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora;

en el que dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora es preferiblemente de origen humano,

en el que el primer dominio de la primera cadena peptídica forma junto con uno de los dominios de la segunda cadena peptídica un primer sitio de unión al antígeno, y

- 10 en el que el segundo dominio de la primera cadena peptídica forma junto con el otro dominio de la segunda cadena peptídica un segundo sitio de unión al antígeno.
2. El receptor de la reivindicación 1, en el que el dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora comprende una región constante o invariable de una cadena de receptor de células T o una región constante o invariable de una cadena de receptor de Fc de células inmunes o una porción de la región constante o invariable.
- 15 3. El receptor de la reivindicación 1 o 2, en el que las cadenas peptídicas primera y/o segunda comprenden además un enlazador entre los dominios primero y segundo y/o entre los dominios primero y segundo y el dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora.
4. El receptor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el primer y/o el segundo dominio comprenden cada uno una región variable de una cadena de inmunoglobulina o una región variable de una cadena de receptor de células T o una porción de la región variable.
- 20 5. El receptor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que

(i) la primera cadena peptídica comprende una región constante de una cadena alfa del receptor de células T o una porción de la misma y la segunda cadena peptídica comprende una región constante de una cadena beta del receptor de células T o una porción de la misma, o

- 25 (ii) el primer péptido la cadena comprende una región constante de una cadena beta del receptor de células T o una porción de la misma y la segunda cadena peptídica comprende una región constante de una cadena alfa del receptor de células T o una porción de la misma.
6. El receptor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el primer dominio de la primera cadena peptídica comprende una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina con una especificidad para un antígeno o una porción del mismo y el dominio del segundo péptido que forma la cadena de un sitio de unión al antígeno con el primer dominio de la primera cadena peptídica comprende una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina con una especificidad por el antígeno o una porción del mismo.
- 30 7. El receptor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el segundo dominio de la primera cadena peptídica comprende una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina con una especificidad para un antígeno o una porción del mismo y el dominio del segundo péptido que forma la cadena de un sitio de unión al antígeno con el segundo dominio de la primera cadena peptídica comprende una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina con una especificidad por el antígeno o una porción del mismo.
- 35 8. El receptor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los sitios de unión al antígeno primero y segundo se unen al mismo antígeno o antígenos diferentes.
- 40 9. El receptor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que

el primer y el segundo dominio de la primera cadena peptídica comprenden cada uno una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina o una porción de la misma; y

el primer y el segundo dominio de la segunda cadena peptídica comprenden cada uno una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina o una porción de la misma.

- 45 10. El receptor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que

el dominio N-terminal de la primera cadena peptídica forma junto con el dominio N-terminal de la segunda cadena peptídica un sitio de unión al antígeno; y

el dominio C-terminal de la primera cadena peptídica forma junto con el dominio C-terminal de la segunda cadena peptídica un sitio de unión al antígeno.

11. Una cadena peptídica que comprende un primer y un segundo dominio que comprenden cada uno una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina o cada uno comprende una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina y en donde la cadena peptídica comprende además un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora.
- 5 12. Una célula recombinante que expresa las cadenas peptídicas primera y segunda definidas en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
13. Una célula recombinante que expresa la cadena peptídica de la reivindicación 11.
14. Un método *ex vivo* para producir una célula que expresa un receptor de antígeno cuyo receptor comprende una primera cadena peptídica y una segunda cadena peptídica, el método comprendiendo:
- 10 (a) proporcionar una célula, preferiblemente una célula humana;
- (b) proporcionar una primera construcción genética que codifica para la primera cadena peptídica que comprende al menos un primer y un segundo dominio, y un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora;
- (c) proporcionar una segunda construcción genética que codifica para la segunda cadena peptídica que comprende al menos un primer y un segundo dominio y un dominio de transmisión de la señal inmunoreceptora;
- 15 (d) introducir las construcciones genéticas primera y segunda en la célula; y
- (e) permitir que las construcciones se expresen en la célula;
- en la que la célula es preferiblemente una célula T,
- en el que el primer dominio de la primera cadena peptídica puede formar junto con uno de los dominios de la segunda cadena peptídica un primer sitio de unión al antígeno, y
- 20 en el que el segundo dominio de la primera cadena peptídica puede formar junto con el otro dominio de la segunda cadena peptídica un segundo sitio de unión al antígeno,
- en la que la primera cadena peptídica y la segunda cadena peptídica se proporcionan preferiblemente en una única construcción genética.
- 25 15. Un ácido nucleico que codifica para las cadenas peptídicas primera y segunda definidas en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el ácido nucleico es preferiblemente ADN o ARN.
16. Un ácido nucleico que codifica para la cadena peptídica de la reivindicación 11, en el que el ácido nucleico es preferiblemente ADN o ARN.
17. Una composición farmacéutica que comprende
- (a) el receptor de antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10,
- 30 (b) la célula recombinante de la reivindicación 12,
- (c) un ácido nucleico de la reivindicación 15, o
- (d) un ácido nucleico que codifica para la primera cadena peptídica y un ácido nucleico que codifica para la segunda cadena peptídica, definiéndose dichas cadenas como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;
- y un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente para uso como un medicamento.
- 35 18. Una composición farmacéutica que comprende a el receptor de antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, la célula recombinante de la reivindicación 12 o el ácido nucleico de la reivindicación 15; y un portador farmacéuticamente aceptable para utilizar en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por la expresión de al menos un antígeno que está unido por el receptor de antígeno, en el que la enfermedad es preferiblemente una enfermedad cancerígena.

Figura 1

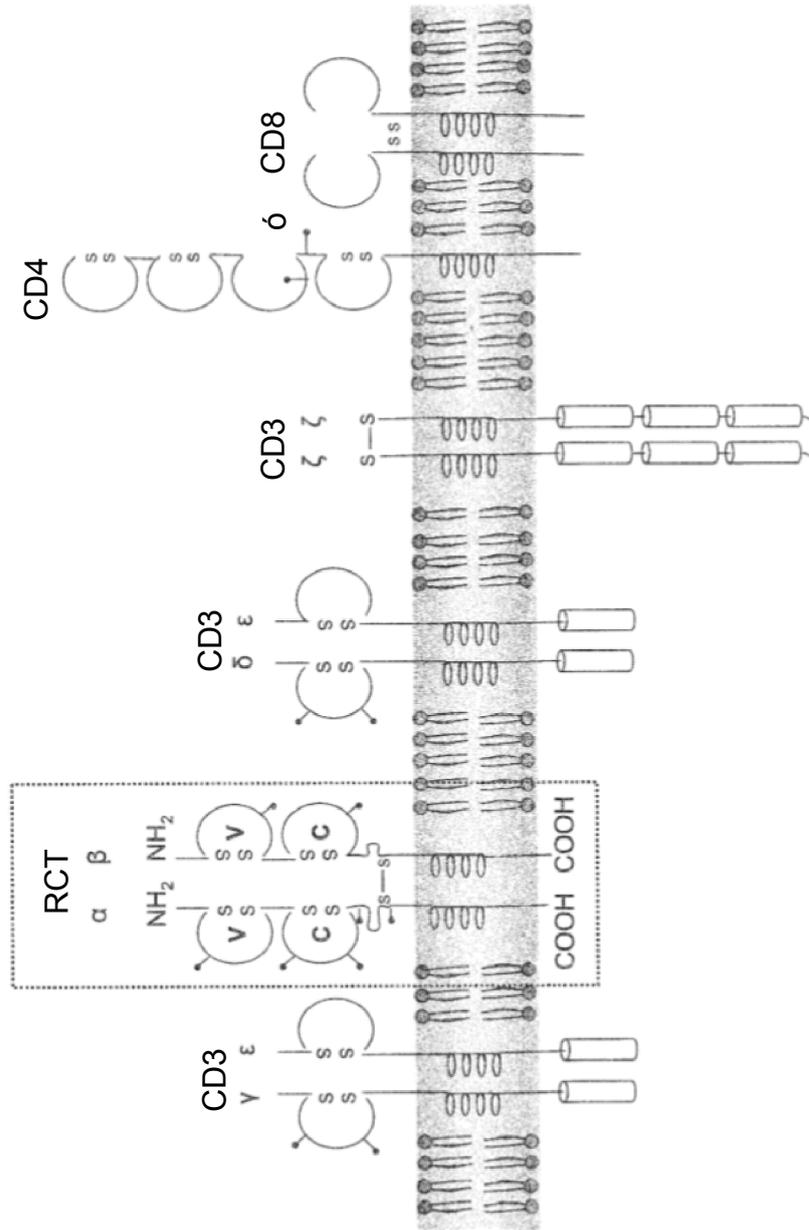


Figura 2

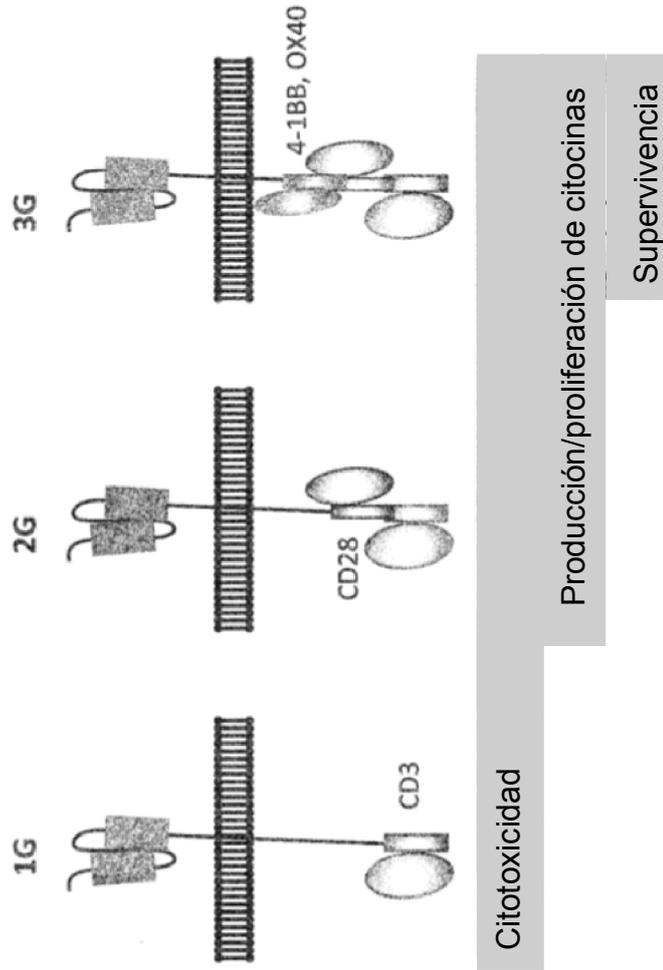


Figura 3

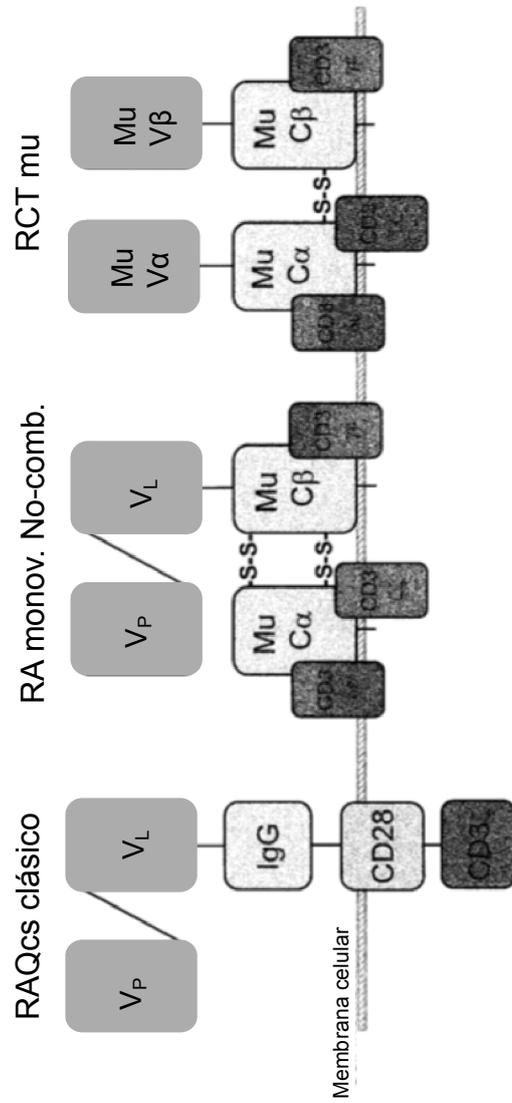


Figura 4A

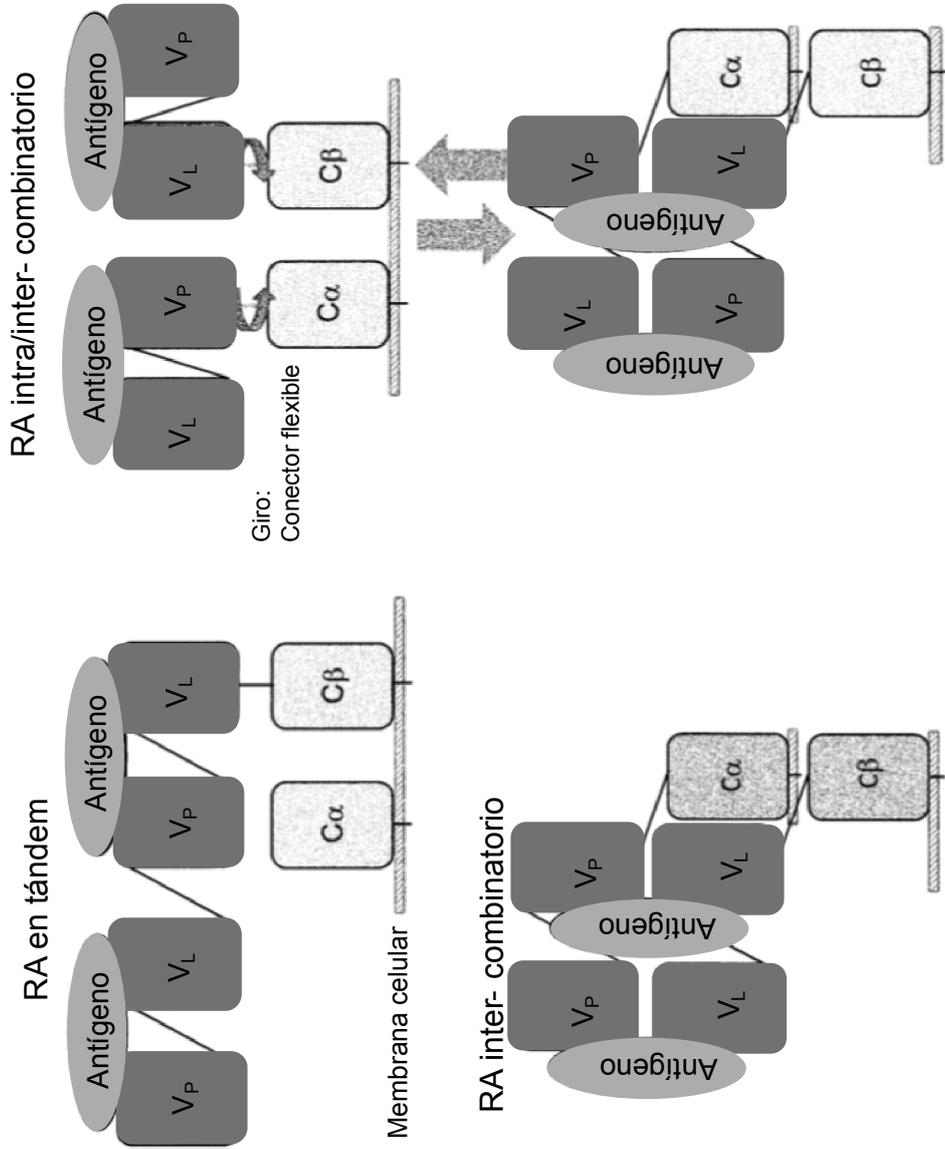


Figura 4B

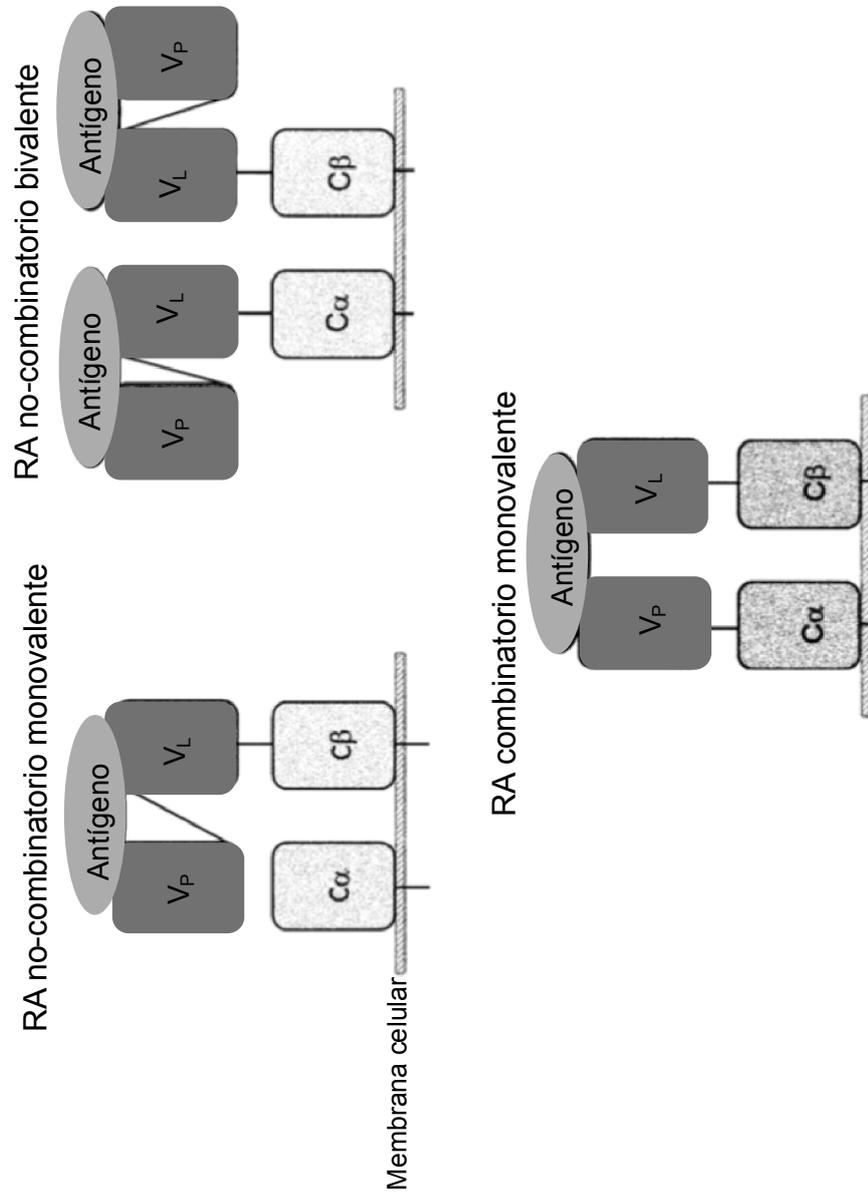


Figura 5

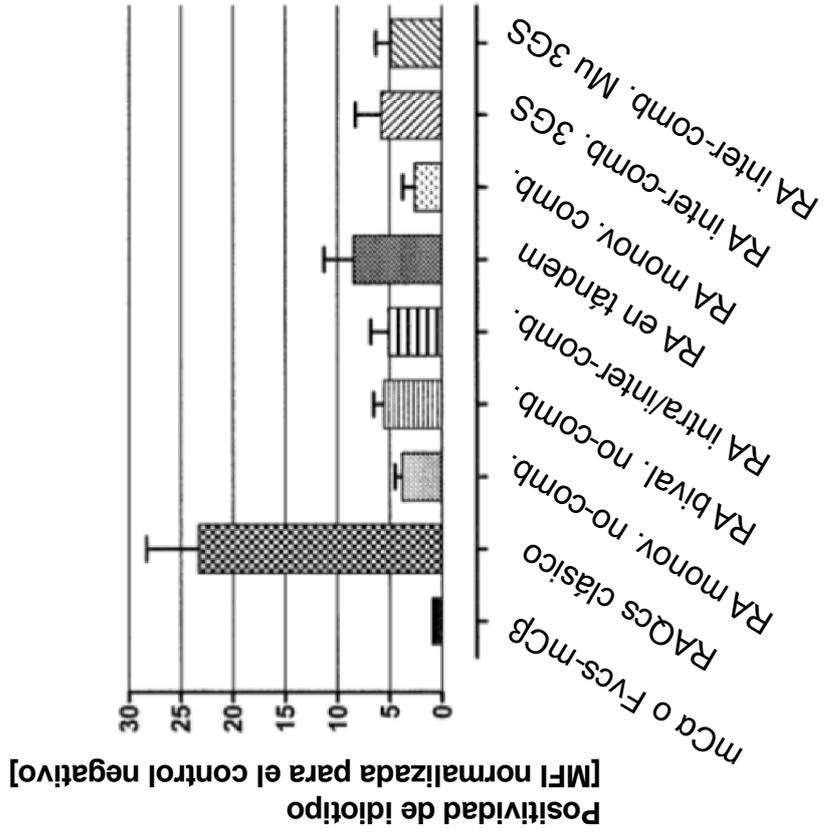


Figura 6A

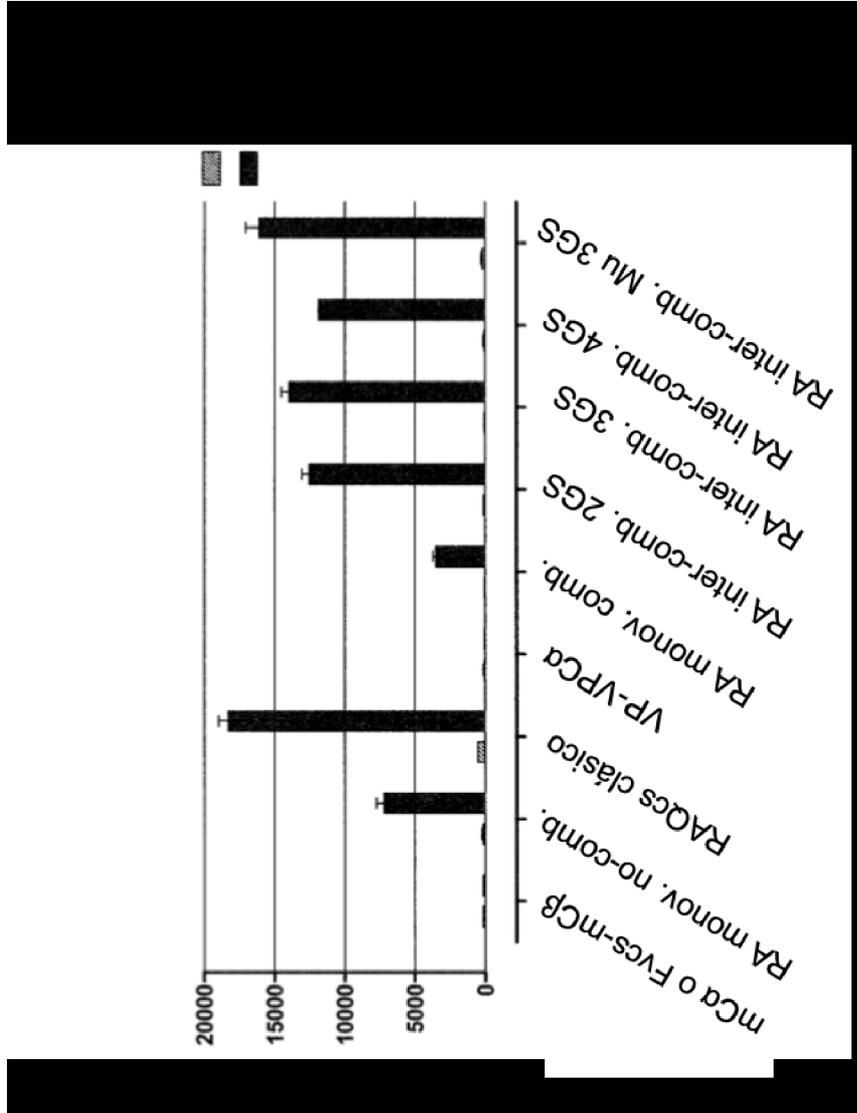


Figura 6B



Figura 6C

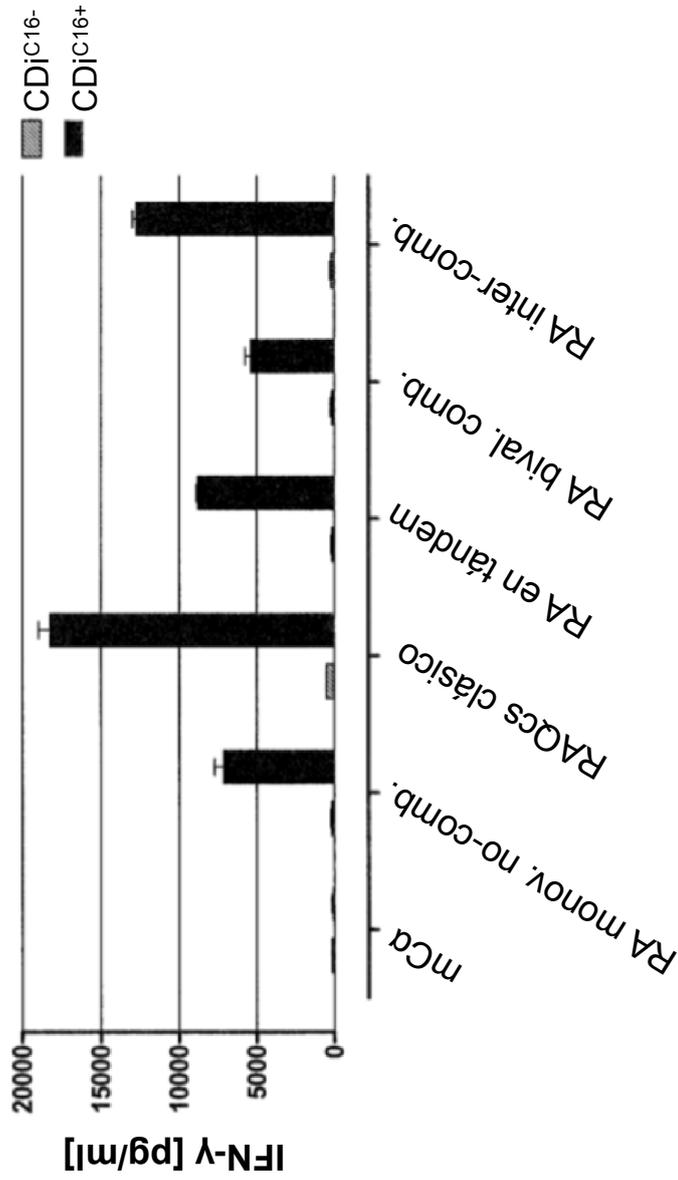


Figura 7

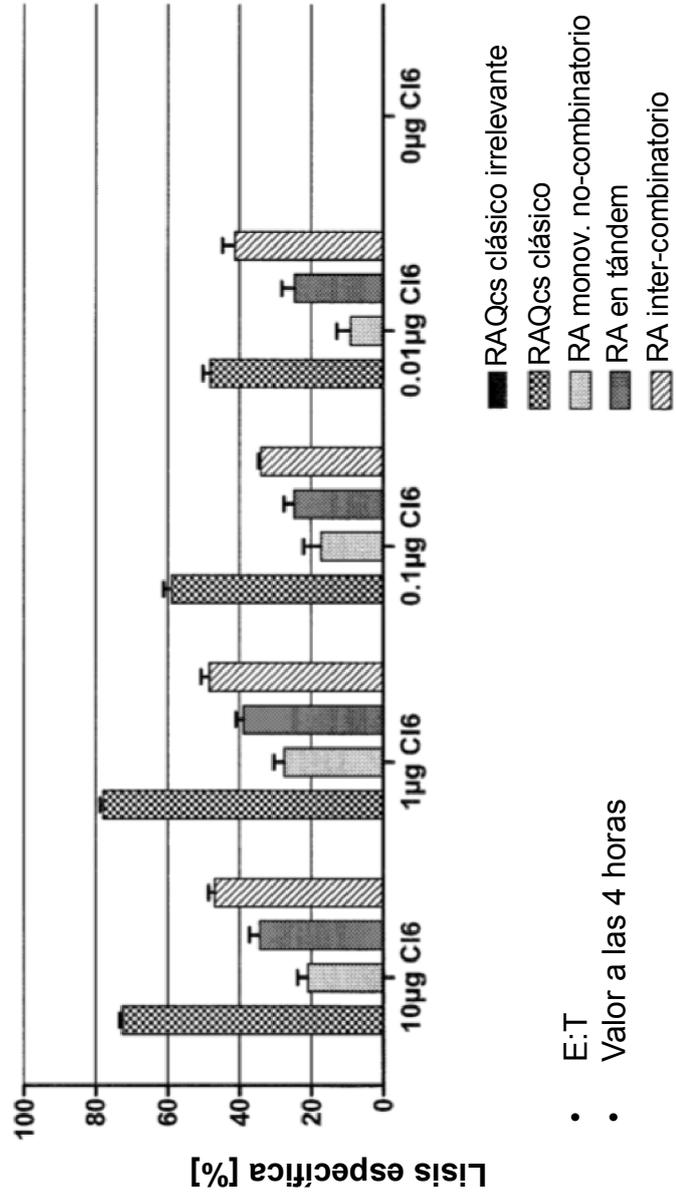


Figura 8A

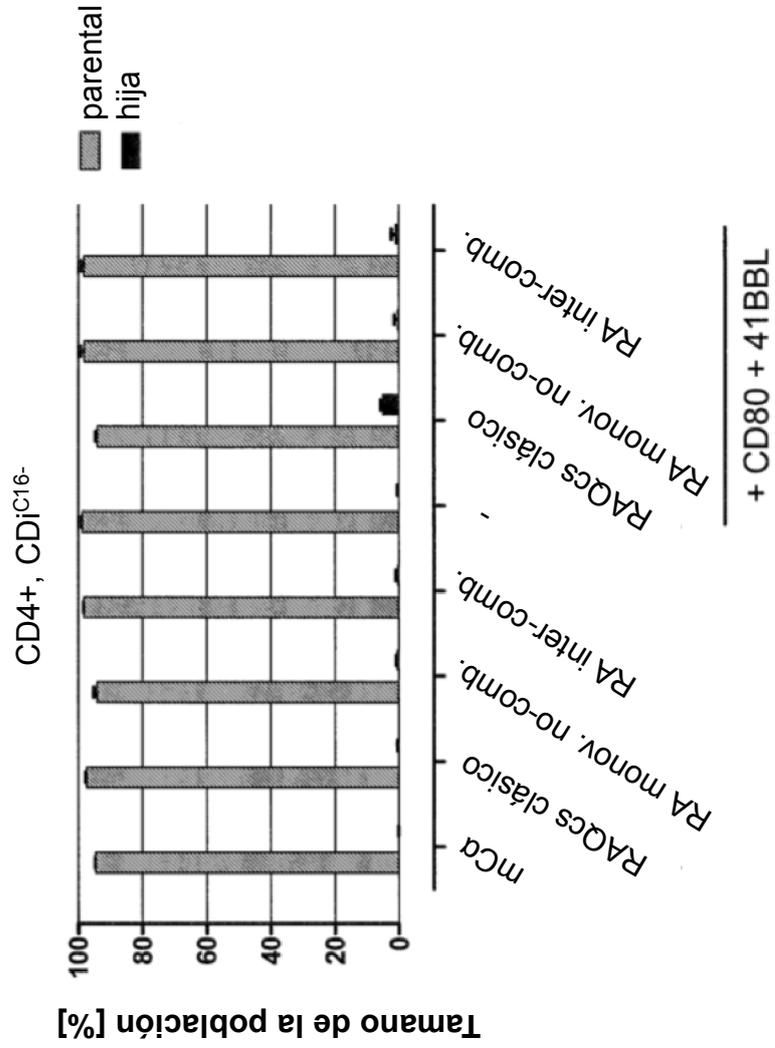




Figura 8C

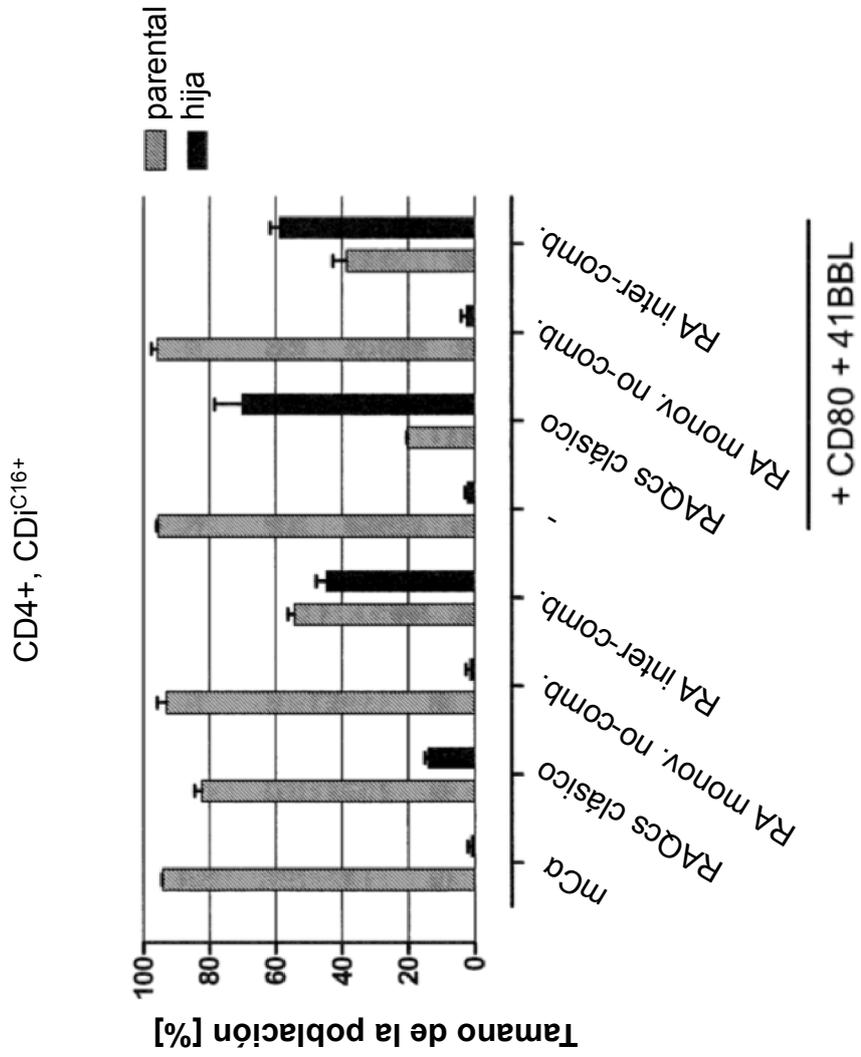


Figura 8D

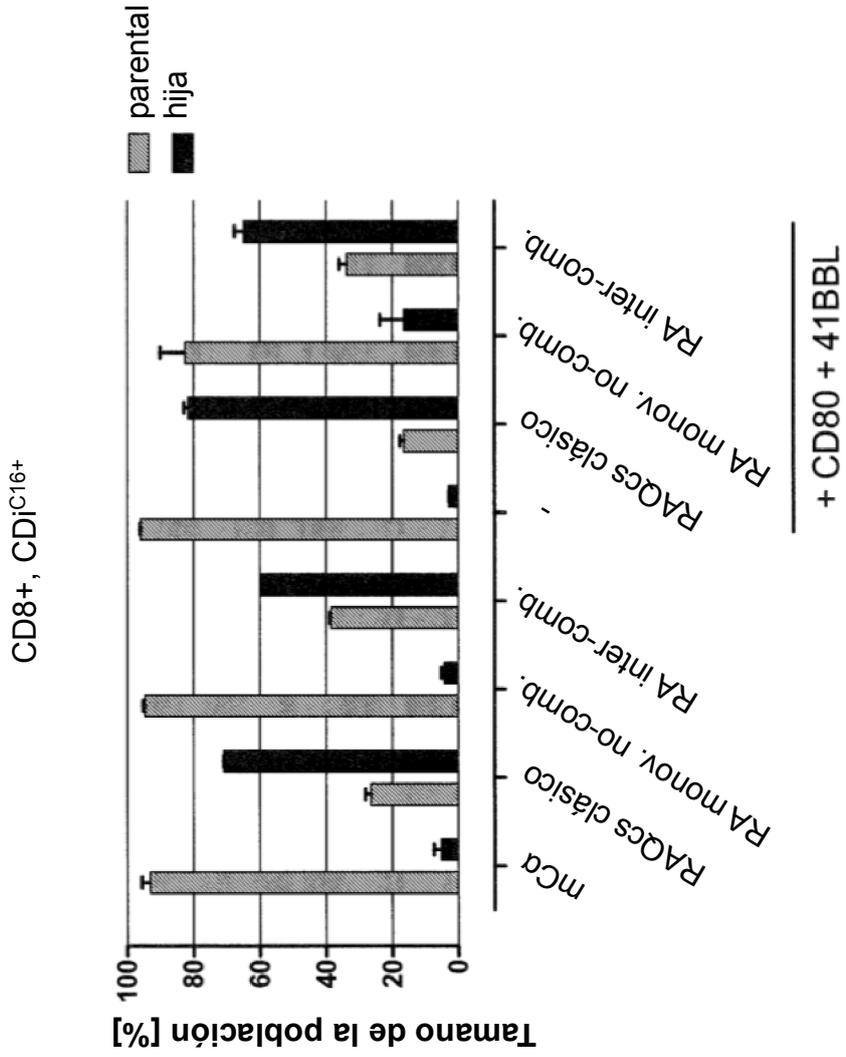


Figura 9A

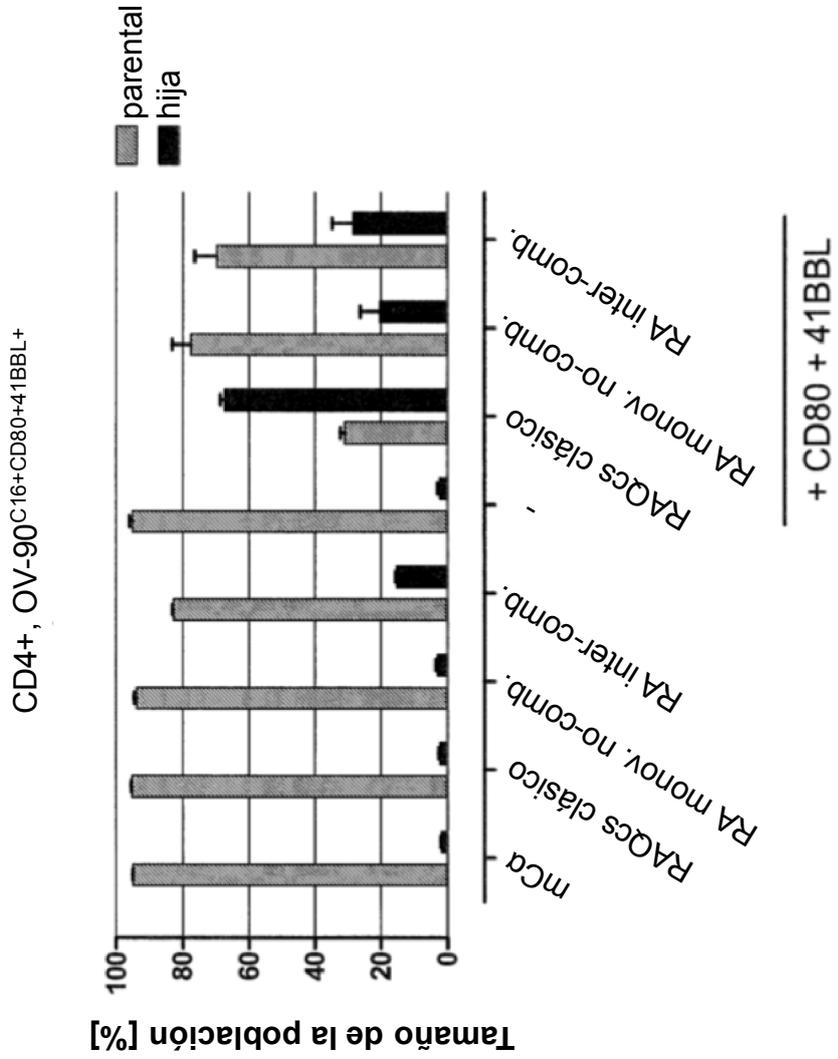


Figura 9B

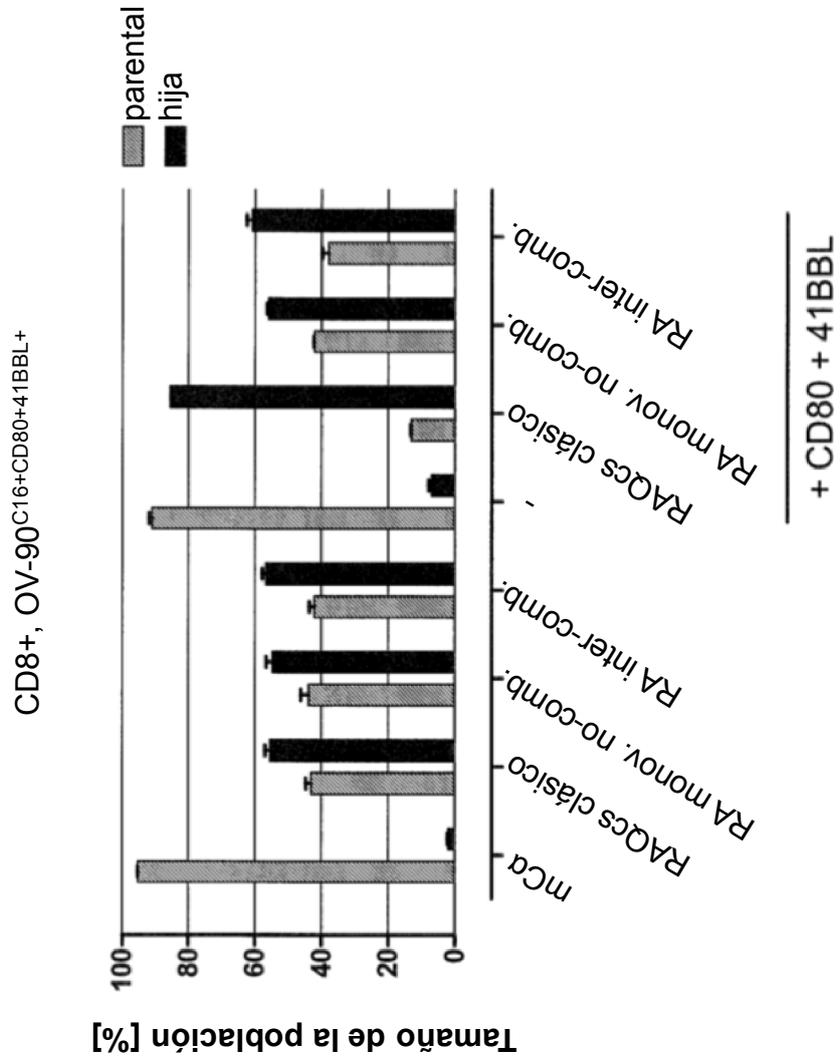


Figura 10

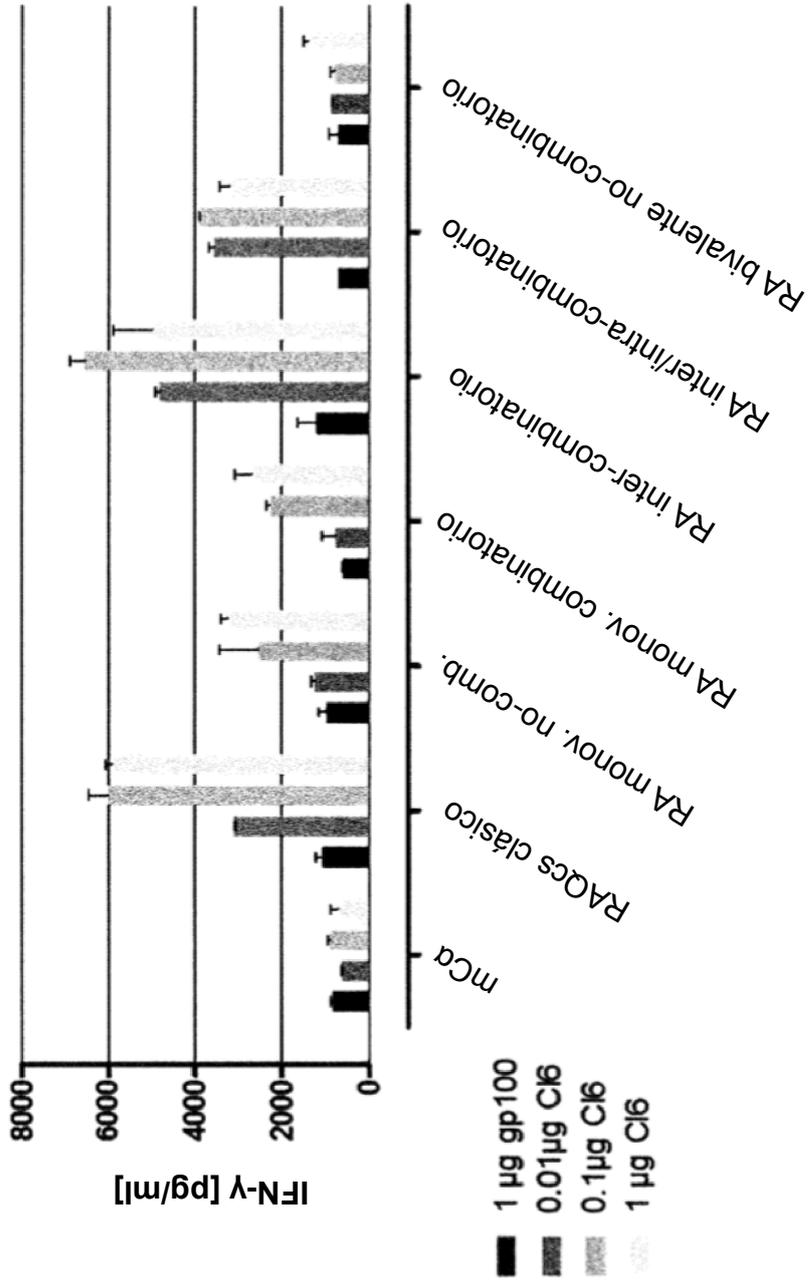


Figura 11

