

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 527**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2016** **PCT/GB2016/050795**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016** **WO16151315**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2016** **E 16712424 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019** **EP 3274366**

54 Título: **Receptor quimérico para antígeno**

30 Prioridad:

23.03.2015 GB 201504840

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

13.07.2020

73 Titular/es:

UCL BUSINESS LTD (100.0%)
The Network Building, 97 Tottenham Court Road
London W1T 4TP, GB

72 Inventor/es:

PULÉ, MARTIN y
CORDOBA, SHAUN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 773 527 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

Receptor quimérico para antígeno

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un receptor quimérico para antígeno (CAR), que comprende un dominio espaciador particular que provoca la formación de moléculas CAR multiméricas en la superficie celular. La molécula CAR multimérica puede ser "supersensible" y capaz de inducir la activación de linfocitos T en respuesta a la unión de un antígeno que se expresa a baja densidad de una célula diana.

Antecedentes de la invención

15 *Receptores quiméricos para antígenos (los CAR)*

Tradicionalmente, los linfocitos T específicos de antígeno se han generado por expansión selectiva de linfocitos T de sangre periférica específicos de forma nativa para el antígeno diana. Sin embargo, es difícil ya menudo imposible seleccionar y expandir grandes cantidades de linfocitos T específicos para la mayoría de los antígenos de cáncer. La terapia génica con vectores de integración brinda una solución a este problema, ya que la expresión transgénica del Receptor Quimérico para Antígeno (CAR) permite la generación de grandes cantidades de linfocitos T específicos para cualquier antígeno de superficie mediante transducción de vectores víricos *ex vivo* de una población masiva de linfocitos T de sangre periférica.

Los receptores quiméricos para antígenos son proteínas que injertan la especificidad de un ligante de antígeno, tal como un anticuerpo monoclonal (Acm), a la función efectora de un linfocito T. Su forma habitual es la de una proteína de dominio transmembrana de tipo I con un extremo amino que reconoce el antígeno, un espaciador, un dominio transmembrana, todo ello conectado a un endodominio complejo que transmite señales de supervivencia y activación de linfocitos T (véase la Figura 1A).

La forma más común de estas moléculas son fusiones de fragmentos variables monocatenarios (scFv) procedentes de anticuerpos monoclonales que reconocen un antígeno diana, fusionados mediante un espaciador y un dominio transmembrana a un endodominio de señalización. Dichas moléculas dan como resultado la activación de los linfocitos T en respuesta al reconocimiento por el scFv de su diana. Cuando los linfocitos T expresan tal CAR, reconocen y destruyen células diana que expresan el antígeno diana. Se han desarrollado varios CAR contra antígenos asociados a tumor, y las estrategias de transferencia adoptiva utilizando tales linfocitos T que expresan CAR están actualmente en ensayo clínico para el tratamiento de diversos cánceres.

Los CAR a menudo comprenden un dominio espaciador para proporcionar una distancia apropiada entre el dominio de unión al antígeno y la membrana celular y para permitir una orientación, alcance y segregación de las fosfatasa adecuados tras el reconocimiento del ligando.

Los espaciadores comunes utilizados son el Fc de IgG1, el tallo de CD8α y CD28, e incluso pueden ser suficientes la bisagra de IgG1 sola o el ectodominio de CD247, dependiendo del antígeno (Figura 2b).

Estos espaciadores comunes son limitados porque deben contener estructuras de dominio enteras para formar un espaciador funcional o porque están muy glucosilados y los cambios en la longitud de aminoácidos darían lugar a cambios impredecibles en el tamaño del espaciador. Por ejemplo, los espaciadores de IgG deben contener números enteros de dominios de inmunoglobulina. Este requisito de un número entero de dominios estructurales significa que las alteraciones que se pueden hacer a los espaciadores son limitadas.

Además, normalmente los espaciadores enumerados anteriormente son secuencias de aminoácidos primarias largas que se pliegan para formar las estructuras secundarias y terciarias necesarias. Como tales, normalmente están codificados por secuencias largas de ácido nucleico. Este requisito de una secuencia larga de ácido nucleico es un problema para la construcción de los vectores que codifican los CAR.

Los CAR clásicos tienen determinadas restricciones de diseño. Como un CAR clásico es un homodímero, comúnmente hay dos especificidades de unión (idénticas) y una relación de dominios de unión a antígeno con respecto a dominios intracelulares de señalización de linfocitos T de 1:1. Esto impone una determinada estequiometría y limita la flexibilidad del sistema en su conjunto.

Por lo tanto, existe la necesidad de CAR alternativos que ofrezcan una mayor flexibilidad en términos de diseño.

Problemas de afinidad

Los dominios de unión del CAR generalmente proceden de la región variable de anticuerpos preexistentes o anticuerpos seleccionados de una biblioteca. Como resultado, la mayoría de los CAR seleccionados se unen al ligando

afín con una afinidad de nanomolar. En contraste, las propiedades biofísicas de la unión de TCR:péptido:MHC (TCR-pMHC) son habitualmente de 10-1 uM (órdenes de magnitud menores en la afinidad). Aunque las interacciones de mayor afinidad aumentan la especificidad para un ligando a una concentración de receptor dada, está apareciendo evidencia de que el TCR ha evolucionado para tener una afinidad más baja a fin de permitir que los linfocitos T detecten las células diana que expresan baja densidad de péptido MHC afín.

Se ha informado que un linfocito T puede activarse con tan solo diez pMHC afines y que un pMHC puede desencadenar una señal productiva en hasta 200 moléculas de TCR. Se cree que esto se logra mediante un proceso conocido como activación en serie; donde un pMHC afín presente en la célula diana puede pasar por un ciclo de unión, activación y después disociación de un TCR múltiples veces, amplificando de forma eficaz la señal. Como consecuencia, solo se necesita un bajo número de pMHC afín para transducir una señal productiva.

La mayor afinidad de los CAR significa que la disociación molecular de una interacción puede llevar de minutos a horas, a diferencia del TCR, que normalmente está en el orden de segundos. Por esta razón, es poco probable que la señalización del CAR experimente una respuesta de activación en serie eficaz, sino que, en cambio, se base en el ligamiento de un mayor número de receptores. Esto puede limitar los CAR a los ligandos diana que se expresan en las células diana a alta densidad. Se ha estimado que un CAR de alta afinidad precisa que una célula diana exprese >10k moléculas de ligando para suscitar una respuesta destructora eficaz. De manera más específica, utilizando un CAR de primera generación, James *et al.* han demostrado un requisito de ~30.000 moléculas diana/célula diana (que inducen la endocitosis de ~20.000 moléculas CAR) para desencadenar la máxima actividad lítica (S. James *et al.*, The Journal of Immunology, vol. 184 (8) 4284-4294, 2010). Los modelos en animales indican que las células diana que expresan ligandos por debajo del umbral para la destrucción pueden escapar a la detección y pueden restablecer la enfermedad (U. Anurathapan *et al.*, Molecular Therapy, vol. 22 (3) 623-633, 2014).

Un método para aumentar la sensibilidad del CAR a ligandos de baja densidad es utilizar un dominio ligante de baja afinidad que luego pueda imitar la respuesta de activación en serie del TCR-pMHC. Sin embargo, hay varias limitaciones a este enfoque. El uso de un CAR de baja afinidad es actualmente impredecible, debido a la contribución desconocida que desempeñan las moléculas coestimuladoras de formación de pseudodímeros y de adhesión en las respuestas de activación en serie del TCR-pMHC. En la terapia CAR, estas interacciones moleculares varían dependiendo de las células diana y, por lo tanto, es difícil obtener una respuesta de activación en serie sólida. Adicionalmente, los métodos para reducir la afinidad de los CAR para estar a la par con el TCR habitualmente implican comenzar con un CAR de alta afinidad y luego mutar los CDR. Este es un enfoque largo y a menudo fallido que puede provocar resultados impredecibles y aumentar el riesgo de unión fuera de la diana.

El diseño técnico de un CAR que pueda activarse en presencia de un ligando de baja densidad permitiría que la terapia apunte a muchos más cánceres y también reduciría la posibilidad de escape del cáncer.

Por lo tanto, existe una necesidad de CAR que no estén asociados con los problemas expuestos anteriormente.

Sumario de aspectos de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un receptor quimérico para antígeno (CAR) multimérico que comprende al menos 3 polipéptidos formadores del CAR, comprendiendo cada polipéptido formador del CAR:

- (i) un dominio de unión a antígeno;
- (ii) un dominio espaciador en superhélice;
- (iii) un dominio transmembrana; y
- (iv) un endodominio.

La presente invención también proporciona un receptor quimérico para antígeno multimérico que comprende uno o más polipéptidos formadores de CAR como se define anteriormente, junto con uno o más polipéptidos accesorios, comprendiendo el o cada polipéptido accesorio:

- (i) un dominio espaciador en superhélice;
- (ii) un dominio transmembrana; y
- (iii) un endodominio en donde el número total de polipéptidos formadores de CAR y polipéptidos accesorios en el CAR multimérico es inferior a tres.

El dominio en superhélice permite la multimerización de una pluralidad de polipéptidos formadores de CAR y/o polipéptidos accesorios, tal como al menos tres polipéptidos formadores de CAR/polipéptidos accesorios, para formar un CAR multimérico.

El dominio en superhélice puede obtenerse de cualquiera de los siguientes: proteína oligomérica de la matriz del cartílago (POMC), proteína de unión a manosa A, proteína rica en serina en superhélice 1, factor de liberación de polipéptido 2, SNAP-25, SNARE, represor Lac o apolipoproteína E.

El dominio en superhélice comprende una de las secuencias mostradas como SEC ID NO: 1 o 30 a 42, o un fragmento de las mismas, o una variante de las mismas que tiene al menos el 80 % de identidad de secuencia y que retiene la capacidad de formar un oligómero en superhélice.

- 5 El endodominio puede comprender al menos uno de endodominio de CD3 zeta, endodominio de CD28, endodominio de 41BB y endodominio de OX40.

El endodominio puede comprender la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma que tiene al menos el 80 % de identidad de secuencia.

- 10 El dominio de unión a antígeno puede unirse a un antígeno que se expresa a baja densidad en una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede unirse a ROR-1, Typr-1 o BCMA.

El polipéptido formador de CAR puede comprender un elemento capaz de formar un puente con otro CAR.

- 15 Por ejemplo, el elemento puede ser capaz de formar un puente disulfuro con otro CAR que contenga tal elemento.

El polipéptido (o polipéptidos) formador de CAR y/o el polipéptido (o polipéptidos) accesorio en un CAR multimérico pueden comprender distintos endodominios.

- 20 Si el CAR multimérico comprende dos o más polipéptidos formadores de CAR, pueden tener distintos dominios de unión a antígeno, por ejemplo, dominios de unión a antígeno con distintas especificidades de unión.

- 25 Uno de los endodominios del polipéptido formador de CAR y el polipéptido accesorio puede comprender un endodominio de CD3 zeta y el otro endodominio del polipéptido formador de CAR y el polipéptido accesorio puede comprender un endodominio de 41BB. Cuando hay dos polipéptidos accesorios, uno puede comprender el endodominio de 41BB y el otro puede comprender el endodominio de CD28.

El CAR multimérico puede, por ejemplo, ser dimérico, trimérico, tetramérico, pentamérico, hexamérico o heptamérico.

- 30 Un CAR pentamérico puede comprender cualquiera de las siguientes combinaciones de polipéptido formador de CAR y cadenas de polipéptidos accesorios:

Polipéptido formador de CAR	Polipéptido accesorio
5	0
4	1
3	2
2	3
1	4
0	5

- 35 Cuando un CAR multimérico comprende primeros y segundos polipéptidos formadores de CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención, el dominio de unión al antígeno del primer CAR puede unirse a un epítipo distinto que el dominio de unión a antígeno del segundo CAR.

- 40 En esta realización, el dominio de unión al antígeno del primer CAR puede unirse a un antígeno distinto que el dominio de unión a antígeno del segundo CAR.

- 45 En el presente documento se describe un complejo acoplado que comprende al menos dos CAR multiméricos de acuerdo con la invención, en donde un primer CAR en un primer CAR multimérico forma un puente con un segundo CAR en un segundo CAR multimérico, de modo que los primer y segundo CAR multiméricos se acoplan para formar un complejo.

El puente puede ser un puente disulfuro o una estructura en superhélice adicional.

- 50 En el presente documento se describe un sistema de señalización del receptor quimérico para antígeno (CAR), que comprende:

(i) un CAR multimérico que comprende un polipéptido formador de CAR o polipéptido accesorio como se define anteriormente, que comprende un primer dominio de heterodimerización; y

- 55 (ii) un componente de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización y un segundo dominio de heterodimerización;

en donde la heterodimerización entre el primer y segundo dominios de heterodimerización provoca que el CAR multimérico y el componente de señalización formen un complejo de CAR funcional.

El o cada polipéptido (o polipéptidos) formador de CAR o polipéptido (o polipéptidos) accesorio puede comprender una pluralidad de dominios de heterodimerización, de forma que un único polipéptido formador de CAR o polipéptido accesorio es capaz de heterodimerizarse con una pluralidad de componentes de señalización.

5 El componente de señalización de un sistema de señalización de CAR puede comprender una pluralidad de dominios de señalización.

10 La presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido formador de CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención y/o un polipéptido accesorio como se define anteriormente.

La invención también se refiere a construcciones de ácido nucleico que comprenden dos o más secuencias de ácido nucleico.

15 La invención proporciona una construcción de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido formador de CAR y al menos un polipéptido accesorio como se define anteriormente.

En una primera realización del aspecto anterior de la invención, se proporciona una construcción de ácido nucleico que codifica:

- 20 (i) al menos un polipéptido formador de CAR que forma un CAR multimérico de acuerdo con la invención; y
(ii) un componente de señalización intracelular como se define en relación con la invención.

25 La presente invención también proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención o una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

El vector puede ser, por ejemplo, un vector retroviral o un vector lentiviral o un transposón.

30 La presente invención también proporciona una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico o una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la invención y expresa un CAR multimérico de acuerdo con la presente invención.

La célula puede ser un linfocito T o un linfocito NK.

35 La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende una célula de acuerdo con la invención.

La presente invención se refiere a una célula de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad.

40 En el presente documento se describe el uso de una célula de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad.

45 En el presente documento se describe un método para el tratamiento de una enfermedad que comprende la etapa de administrar a un sujeto una célula de acuerdo con la invención.

La enfermedad puede ser cáncer, por ejemplo, leucemia linfocítica crónica (LLC), melanoma o mieloma.

50 En el presente documento se describe un kit que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención, una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la presente invención.

En el presente documento se describe un kit que comprende una célula de acuerdo con la invención.

55 La presente invención también se refiere a un método para fabricar una célula de la invención, que comprende la etapa de introducir un ácido nucleico, una construcción de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la presente invención.

La célula puede ser de una muestra aislada de un sujeto.

60 El uso de un dominio en superhélice como espaciador en un CAR proporciona una serie de ventajas sobre los espaciadores que se han utilizado anteriormente, tales como dominios Fc procedentes de IgG.

65 Por ejemplo, el uso de un dominio en superhélice permite alterar las dimensiones del espaciador en aumentos de 0,15 nm. La adición o sustracción de aminoácidos individuales o de una serie de aminoácidos significa que el tamaño del espaciador en superhélice puede alterarse gradualmente. En contraste, el uso de espaciadores de IgG solo permite la adición o eliminación de dominios de inmunoglobulina completos. Esto significa que el incremento más bajo de cambio es de ~ 4 nm (es decir, el tamaño de un dominio de inmunoglobulina plegado).

Los dominios en superhélice están codificados por un fragmento de ADN más pequeño (por ejemplo, -100 nucleótidos) en comparación con el dominio Fc procedente de IgG (-700 nucleótidos). Esto permite un vector de ADN más pequeño, lo que es importante para mejorar el título vírico y la eficacia de transducción.

5 El uso de un espaciador en superhélice permite una selección a partir de una gran cantidad de espaciadores en superhélice que no se hibridarán de forma cruzada con otros dominios en superhélice. Esto está en contraste con otros espaciadores en que hay un número más limitado de opciones de espaciador.

10 El uso de un separador en superhélice también ofrece una flexibilidad mucho mayor en términos de diseño del CAR que un CAR clásico. Por ejemplo, permite la formación de complejos CAR homo- o hetero-oligoméricos. Los complejos CAR hetero-oligoméricos son útiles cuando se diseñan técnicamente CAR multicadena con endodominios de CD28/OX40/41BB y TCRz para garantizar que cada uno de los endodominios este ubicado con una proximidad óptima a la membrana y esté presente en las relaciones deseadas.

15 Los presentes inventores han diseñado técnicamente un CAR hipersensible sin cambiar las propiedades biofísicas del dominio ligante. Esto es conveniente porque los métodos para reducir la afinidad de los ligantes del CAR son impredecibles y a menudo tienen una especificidad no caracterizada.

20 El CAR hipersensible se proporciona aumentando la valencia del CAR. En particular, el uso de un dominio espaciador en superhélice que es capaz de interactuar para formar un multímero que comprende más de dos CAR, aumenta la sensibilidad a dianas que expresan ligandos de baja densidad debido al aumento de ITAM y la avidéz por el complejo CAR oligomérico.

25 La sensibilidad puede aumentarse al aumentar la relación de señal de la hélice con respecto a la hélice del scFv, entonces cada scFv está unido a muchos elementos de señalización (véase la Figura 10c). La sensibilidad también puede aumentarse a través de la formación de complejos de CAR multiméricos (Figura 10f).

30 En un CAR multimérico de la invención, los endodominios de señalización se proporcionan en *trans* en una ubicación próxima de membrana, lo que permite el ajuste fino de las combinaciones de dominios de señalización de linfocitos T (Figura 10 a y b); y la incorporación de más de tres dominios de señalización intracelular distintos (Figura 10d) de forma que la estructura incluya más señales de endodominio que un CAR de tercera generación (Figura 1d).

35 El uso de una molécula de un componente de señalización intracelular separada que se heterodimeriza con el CAR de forma intracelular, permite la amplificación adicional del número de endodominios por dominio de unión a antígeno, produciendo un "superCAR" (Figura 15).

40 Un CAR multimérico de la invención puede comprender más de una especificidad de unión a antígeno, lo que permite tener como diana a una pluralidad de epítomos o antígenos (Figura 10e).

45 Un CAR multimérico que tenga una pluralidad de dominios de unión tendrá una avidéz mucho mayor que un CAR homodimérico clásico. Esto puede ser importante, por ejemplo, para dominios de unión con baja afinidad, ya que la fuerza acumulada de las múltiples afinidades proporciona una unión de alta especificidad. Un CAR multimérico puede unirse al antígeno de una manera análoga a una IgM, lo que comprende múltiples inmunoglobulinas unidas covalentemente para formar una estructura pentamérica o hexamérica,

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

50 Figura 1 - a) Diagrama esquemático que ilustra un CAR clásico. (b) a (d): Distintas generaciones y permutaciones de endodominios de CAR: (b) los diseños iniciales transmitían señales ITAM en solitario a través del endodominio FcεR1-γ o CD3ζ, mientras que los diseños posteriores transmitían (c) una o (d) dos señales coestimuladoras adicionales en el mismo endodominio compuesto.

55 Figura 2 - a) Diagrama esquemático que ilustra un CAR clásico. b) Diagrama esquemático que ilustra los separadores de CAR comunes. "S" denota enlaces disulfuro.

Figura 3 - Estructuras en superhélice diméricas, triméricas y tetraméricas de origen natural (modificadas de Andrei N. Lupas y Markus Gruber; Adv Protein Chem. 2005;70:37-78)

60 Figura 4 - Estructura cristalina del motivo en superhélice pentamérica de la proteína oligomérica de la matriz de colágeno (COMP) y la IgG1 humana. Las cadenas individuales se representan con distintos colores. La estructura de COMP en superhélice se presenta desde el extremo N, con el extremo C extendiéndose hacia dentro de la página y también se presenta en el dibujo con el extremo C a la izquierda hasta el extremo N a la derecha. La IgG1 humana se presenta en el dibujo desde el extremo N (arriba) hasta el extremo C (abajo).

65 Figura 5 - CAR con espaciador en superhélice. a) Diagrama esquemático que ilustra un CAR con un espaciador

en superhélice pentamérico procedente de COMP. b) Mapa de la construcción que presenta el ORF de los CAR con COMP y los CAR de control. c) Secuencia de aminoácidos del ORF del CAR con COMP anti-CD33 y CAR con COMP anti-ROR-1. c) Secuencia ADN del ORF del CAR con COMP anti-CD33 y CAR con COMP anti-ROR-1.

Figura 6 - Niveles de expresión en superficie del CAR en superhélice. a) Una línea de linfocitos T murinos se transdujo con el CAR con COMP anti-CD33 o CAR con IgG1 anti-CD33. Después, estas células se tiñeron con CD33 quimérico soluble fusionado con Fc de IgG2a murino, antes de una tinción secundaria con anti-IgG de ratón PE. b) Una línea de linfocitos T murinos se transdujo con el CAR con COMP anti-ROR-1 o CAR con IgG1 anti-ROR-1. Después, estas células se tiñeron con ROR-1 soluble etiquetado con His seguido de una tinción secundaria con anti-His-biotina y después una tercera tinción con estreptavidina-APC.

Ejemplo 7 - Estimulación de linfocitos T CAR con COMP anti-ROR-1 con ligando inmovilizado. Los linfocitos T murinos transducidos se cocultivaron con perlas anti-His que se recubrieron previamente con distintas concentraciones de sobrenadante de ROR-1 marcado con His soluble. Se analizó a través de ELISA la cantidad de IL-2 en el sobrenadante del cocultivo después de 16-24 horas.

Figura 8 - Niveles de expresión de ROR-1 en células diana. La línea celular SKW expresa bajos niveles de ROR-1 de forma natural. Estas células se transdujeron con ROR-1 para aumentar los niveles de expresión. Estas células se tiñeron con anti-ROR-1 APC y se compararon con células no teñidas.

Ejemplo 9 - Estimulación de linfocitos T CAR con COMP anti-ROR-1 con células SKW positivas para ROR-1. Los linfocitos T murinos transducidos se cocultivaron con células diana SKW que expresan el ligando ROR-1 en una densidad baja o alta. Los linfocitos T se mantuvieron en un número constante y se varió el número de células diana. Se analizó a través de ELISA la cantidad de IL-2 en el sobrenadante del cocultivo después de 16-24 horas. La región sombreada en gris denota el intervalo de la curva patrón para ese experimento. La línea azul punteada es la secreción promedio de IL-2 de la estimulación con PMA y ionomicina. La línea punteada roja es el promedio de IL-2 detectada a partir de cultivos solo de linfocitos T (no estimulados).

Figura 10 - Diseños de CAR en superhélice. a) Diagrama esquemático que ilustra un CAR compuesto por un polipéptido formador de CAR y un polipéptido accesorio. El polipéptido formador de CAR proporciona una señal al linfocito T y consiste en un ligante de scFv en el extremo N, seguido de un espaciador de COMP, un transmembrana y el TCRz. El polipéptido accesorio proporciona la señal tres al linfocito T y no consiste en ligante de ligando N-terminal, sino que comienza con el espaciador de COMP seguido de un transmembrana y el motivo de señalización de 41BB; b) Diagrama esquemático que ilustra otro sistema CAR en superhélice que incluye un polipéptido formador de CAR y dos polipéptidos accesorios. El polipéptido formador de CAR proporciona una señal al linfocito T y consiste en un ligante de scFv en el extremo N, seguido de un espaciador de COMP, un transmembrana y el TCRz. El primer polipéptido accesorio proporciona la señal dos al linfocito T y no consiste en ligante de ligando N-terminal, sino que comienza con el espaciador de COMP seguido de un transmembrana y el motivo de señalización de CD28. El segundo polipéptido accesorio proporciona la señal tres al linfocito T y no consiste en ligante de ligando N-terminal, sino que comienza con el espaciador de COMP seguido de un transmembrana y el motivo de señalización de 41BB. "S" denota enlaces disulfuro. Esta disposición permite que los endodominios de señalización estén en *trans* en una ubicación próxima de membrana, lo que conduce a una señalización mejor; c) Diagrama esquemático que ilustra otro sistema CAR en superhélice en el que la relación de scFv:hélice es mucho menor que la de hélice:señal, por lo que cada scFv está unido a muchos elementos de señalización. Este es un sistema de amplificación: limitando el scFv a uno por complejo, cada ligando acoplado señalará a través de 5 cadenas de TCRz (dos ligandos a través de 10TCRz). Esto es opuesto a los CAR diméricos tradicionales, donde dos ligandos señalan a través de 2 cadenas de TCRz. Este sistema esencialmente aumentará la potencia de activación en 5 veces; d) Diagrama esquemático que ilustra otro sistema CAR en superhélice que comprende más endodominios que un CAR de tercera generación. El espaciador en superhélice permite la introducción de dos dominios de señalización adicionales ("EXTRA") además de un CAR tradicional de tercera generación; e) Diagrama esquemático que ilustra otro sistema de señalización CAR en superhélice que comprende múltiples dianas (en este caso se muestran dos especificidades de unión a la diana: uno que se une al ligando A y otro que se une al ligando B). Esta disposición es una arquitectura alternativa para un TanCAR; f) Diagrama esquemático que ilustra otro sistema CAR en superhélice que comprende un elemento que forma un enlace como puentes disulfuro con otro espaciador de CAR en espiral, lo que proporciona un complejo acoplado que aumenta adicionalmente la valencia del scFv:dominio de señalización. Al igual que la disposición que se muestra en la Figura 10c), este es un sistema de amplificación. Cada complejo acoplado enviará señales a través de 10 cadenas TCRz. A diferencia de los CAR diméricos tradicionales que señalan a través de 2 cadenas TCRz. Este sistema esencialmente aumentará la potencia de activación en 5 veces. El reemplazo de la bisagra de IgG por una estructura en superhélice trimérica aumentaría esto a poco menos de 8 veces, mientras que una superhélice tetramérica lo aumentaría 10 veces.

Figura 11 - Truncamiento del espaciador COMP

a) diagrama esquemático que muestra el CAR con COMP anti-ROR-1, el espaciador COMP se truncó desde el extremo N de 45 aminoácidos a "x" aminoácidos

b) Se transfectaron células 293T con las construcciones truncadas y se analizaron por FACS.

Figura 12 - Diagrama esquemático que muestra los CAR multiméricos y clásicos analizados en el Ejemplo 6

- 5 A) un CAR heteromultimérico que comprende: un polipéptido que tiene un dominio de unión a antígeno anti-CD19; un dominio espaciador en superhélice y un endodominio de CD3zeta; y un polipéptido accesorio que tiene un dominio espaciador en superhélice y un endodominio de 41BB. El CAR está codificado por una construcción bicistrónica que tiene la estructura: aCD19fmc63-COMP-CD28tmZ-2A-COMP-CD28tm-41BB. En esta estructura CAR, los motivos de señalización de 41BB y TCRzeta están en paralelo.
- 10 B) un CAR homomultimérico compuesto por polipéptidos que comprenden un dominio de unión a antígeno anti-CD19; un dominio espaciador en superhélice y un endodominio combinado de 41BB/CD3zeta. El CAR está codificado por una construcción que tiene la estructura: aCD19fmc63-COMP-CD8TM-41BB-Z. En esta estructura CAR, los motivos de señalización de 41BB y TCRzeta están en orden secuencial.
- 15 C) un CAR homodimérico clásico de segunda generación que comprende dos polipéptidos que tienen un dominio de unión a antígeno anti-CD19, un dominio espaciador del tallo de CD8 y un endodominio combinado de 41BB/CD3zeta. El CAR está codificado por una construcción bicistrónica que también codifica el gen suicida RQR8. La construcción tiene la estructura: RQR8-2A-aCD19fmc63-talloCD8-41BBZ.

Figura 13 - Destrucción de células diana SupT1 CD19+ mediante los CAR mostrados en la Figura 12, en el día 2.

Figura 14 - Destrucción de células diana SupT1 CD19+ mediante los CAR mostrados en la Figura 12, en el día 5.

Figura 15 - Diagrama esquemático de las construcciones de SuperCAR en superhélice analizadas en el Ejemplo 7:

- 25 aCD19-Fc de IgG-Z - un CAR homodimérico clásico que comprende 2 moléculas de TCRz por molécula, que tiene el ligante aCD19 de fmc63.
- Un SuperCAR en superhélice compuesto por cinco polipéptidos, comprendiendo cada uno cuatro dominios AD1 separados. El SuperCAR en superhélice, por lo tanto, comprende 20 dominios AD1.
- 30 COMP_x4AD1 - el SuperCAR en superhélice se analizó en combinación con un componente de señalización que tienen 0 copias del dominio de señalización del TCR zeta. Este se usó como control negativo.
- COMP_x4AD1 + Z-DDD1-Z - el SuperCAR en superhélice se analizó en combinación con un componente de señalización que tienen 2 copias del dominio de señalización del TCR zeta. Como DDD1 se une a AD1 con una estequiometría de 2:1, este dominio de señalización arroja 80 copias del dominio de TCR zeta para cada componente de direccionamiento del CAR en superhélice de 5 polipéptidos.

Figura 16 - Liberación de IL2 después de la exposición a células diana que expresan el antígeno afín (CD19) a distintas concentraciones: baja, media y alta.

Descripción detallada

RECEPTORES QUIMÉRICOS PARA ANTÍGENOS (los CAR)

Los CAR clásicos, que se muestran de forma esquemática en la Figura 1, son proteínas transmembrana de tipo I quiméricas que conectan un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular (ligante) con un dominio de señalización intracelular (endodominio). El ligante es, normalmente, un fragmento variable monocatenario (scFv) procedente de un anticuerpo monoclonal (Acm), pero puede basarse en otros formatos que comprenden un sitio de unión a antígeno similar a un anticuerpo o basado en ligando. Un dominio transmembrana ancla la proteína en la membrana celular y conecta el espaciador al endodominio.

Los primeros diseños de CAR tenían endodominios procedentes de partes intracelulares de la cadena γ de Fc ϵ R1 o CD3 ζ . En consecuencia, estos receptores de primera generación transmitían la señal inmunológica 1, que era suficiente para desencadenar la destrucción por linfocitos T de las células diana afines, pero no podían activar completamente al linfocito T para proliferar y sobrevivir. Para superar esta limitación, se han construido endodominios compuestos: la fusión de la parte intracelular de una molécula coestimuladora de linfocitos T con la de CD3 ζ da como resultado receptores de segunda generación que pueden transmitir una señal activadora y coestimuladora de forma simultánea después del reconocimiento del antígeno. El dominio coestimulador utilizado más habitualmente es el de CD28. Este suministra la señal coestimuladora más potente, es decir, la señal inmunológica 2, que desencadena la proliferación de linfocitos T. Además, se han descrito algunos receptores que incluyen los endodominios de la familia de receptores de TNF, tales como los estrechamente relacionados OX40 y 41BB, que transmiten señales de supervivencia. Incluso se han descrito CAR más potentes de tercera generación que tienen endodominios capaces de transmitir señales de activación, proliferación y supervivencia.

Los ácidos nucleicos que codifican CAR pueden transferirse a linfocitos T utilizando, por ejemplo, vectores retrovíricos. De esta forma, puede generarse una gran cantidad de linfocitos T específicos de antígeno para transferencia celular adoptiva. Cuando el CAR se une al antígeno diana, esto da como resultado la transmisión de una señal de activación al linfocito T en el que se expresa. Por lo tanto, el CAR dirige la especificidad y la citotoxicidad del linfocito T hacia las

células que expresan el antígeno diana. El presente CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio espaciador en superhélice, un dominio transmembrana y un endodominio. El dominio espaciador en superhélice proporciona numerosas ventajas sobre los espaciadores descritos anteriormente en la técnica.

5 DOMINO EN SUPERHÉLICE

Los CAR normalmente comprenden una secuencia espaciadora para conectar el dominio de unión a antígeno con el dominio transmembrana. El espaciador permite que el dominio de unión al antígeno tenga una orientación y alcance adecuados. El espaciador también proporciona segregación de las fosfatasa tras el acoplamiento del ligando.

El CAR multimérico de la presente invención comprende dominios espaciadores en superhélice.

Una superhélice es un motivo estructural en el que de dos a siete hélices alfa se envuelven juntas como los hilos de una cuerda (Figura 3). Muchas proteínas endógenas incorporan dominios en superhélice. El dominio en superhélice puede estar implicado en el plegamiento de proteínas (por ejemplo, interactúa con varios motivos en hélice alfa dentro de la misma cadena proteica) o ser responsable de la interacción proteína-proteína. En este último caso, la superhélice puede iniciar estructuras homo o hetero oligoméricas.

Como se usa en el presente documento, los términos 'multímero' y 'multimerización' son sinónimos e intercambiables con 'oligómero' y 'oligomerización'.

La estructura de los dominios en superhélice es bien conocida en la técnica. Por ejemplo, como describe Lupas y Gruber (Advances in Protein Chemistry; 2007; 70; 37-38).

Las superhélices habitualmente contienen un patrón repetido, hxxhxcx, de restos de aminoácidos hidrófobos (h) y cargados (c), denominados una repetición en héptada. Las posiciones en la repetición en héptada habitualmente se etiquetan como abcdefg, donde a y d son las posiciones hidrófobas, a menudo ocupadas por isoleucina, leucina o valina. Plegar una secuencia con este patrón de repetición en una estructura secundaria en hélice alfa hace que los restos hidrófobos se presenten como una 'franja' que se enrolla suavemente alrededor de la hélice de manera levógira, formando una estructura anfipática. La forma más favorable para que dos de tales hélices se dispongan en el citoplasma es que las hebras hidrófobas se envuelvan una contra otra, dispuestas entre los aminoácidos hidrófilos. Por tanto, es el entierro de las superficies hidrófobas lo que proporciona la fuerza motriz termodinámica para la oligomerización. El empaquetamiento en una interfaz en superhélice es excepcionalmente apretado, con contacto de van der Waals casi completo entre las cadenas laterales de los restos a y d.

Las hélices α pueden ser paralelas o antiparalelas, y habitualmente adoptan una superhélice levógira. Aunque menos probables, también se han observado en la naturaleza y en proteínas diseñadas algunas superhélices dextrógiras.

El dominio en superhélice puede ser cualquier dominio en superhélice que sea capaz de formar un multimérico en superhélice de forma que se forme un complejo de CAR o polipéptidos accesorios que comprendan el dominio en superhélice.

La relación entre la secuencia y la estructura plegada final de un dominio en superhélice se entiende bien en la técnica (Mahrenholz *et al*; Molecular & Cellular Proteomics; 2011; 10(5):M110.004994). Como tal, el dominio en superhélice puede ser un dominio en superhélice generado de forma sintética.

Los ejemplos de proteínas que contienen un dominio en superhélice incluyen, pero sin limitación, proteína motora kinesina, antígeno delta de hepatitis D, proteína nuclear de la RNPP de caja C/D de arqueas, proteína oligomérica de la matriz del cartílago (POMC), proteína de unión a manosa A, proteína rica en serina en superhélice 1, factor de liberación de polipéptido 2, SNAP-25, SNARE, represor Lac o apolipoproteína E.

A continuación, se muestra la secuencia de diversos dominios en superhélice:

Proteína motora kinesina: homodímero paralelo (SEQ ID NO: 30)

MHAALSTEVVHLRQRTEELLRCNEQQAEELETCKEQLFQSNMERKELHNTVMDLRGN

antígeno delta de hepatitis D: homodímero paralelo (SEQ ID NO: 31)

GRDILEQWVSGRKKLEELERDLRLKLLKKIKKLEEDNPWLGNIKGIIIGKY

Proteína nuclear de la RNPP de caja C/D de arqueas: heterodímero antiparalelo (SEQ ID NO: 32)

RYVVALVKALEEIDESINMLNEKLEDIRAVKESEITEKFEKKIRELRELRRDVEREIEEVM

Proteína de unión a manosa A: homotrímero paralelo (SEQ ID NO: 33)

AIEVKLANMEAEINTLKSLELTNKLHAFSM

Proteína rica en serina en superhélice 1: homotrímero paralelo (SEQ ID NO: 34)

EWEALEKKLAALESKLQALEKKLEALEHG

Factor de liberación de polipéptido 2: heterotrímero antiparalelo

- 5 Cadena A: INPVNNRIQDLTERSDVLRGYLDY (SEQ ID NO: 35)
Cadena B: VVDTLQMKQGLSDVSGLELAVEADDEETFNEAVAELDALEEKLAQLEFR (SEQ ID NO: 36)

SNAP-25 y SNARE: heterotetrámero paralelo

- 10 Cadena A: IETRHSEIIKLENSIRELHDMFMDMAMLVESQGEMIDRIEYNVEHAVDYVE (SEQ ID NO: 37)
Cadena B: ALSEIETRHSEIIKLENSIRELHDMFMDMAMLVESQGEMIDRIEYNVEHAVDYVERA VSDTKKAVKY (SEQ ID NO: 38)
- 15 Cadena C: ELEEMQRRADQLADESLESTRMLQLVEESKDAGIRTLVMLDEQGEQLERIEE
GMDQINKDMKEAEKNL (SEQ ID NO: 39)
- Cadena D: IETRHSEIIKLENSIRELHDMFMDMAMLVESQGEMIDRIEYNVEHAVDYVE (SEQ ID NO: 40)

- 20 Represor lac: homotetrámero paralelo
SPRALADSLMQLARQVSRLE (SEQ ID NO: 41)

Apolipoproteína E: heterotetrámero antiparalelo

- 25 SGQRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEE
QLTARLSKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKR
LLRDADDLQKRLAVYQA (SEQ ID No. 42)

- 30 El dominio en superhélice es capaz de oligomerizarse. En determinadas realizaciones, el dominio en superhélice puede ser capaz de formar un trímero, un tetrámero, un pentámero, un hexámero o un heptámero.

- Un dominio en superhélice es distinto de una cremallera de leucina. Las cremalleras de leucina son estructuras súper secundarias que funcionan como dominios de dimerización. Su presencia genera fuerzas de adhesión en hélices alfa paralelas. Una única cremallera de leucina consta de múltiples restos de leucina a intervalos de aproximadamente 7 restos, que forma una hélice alfa anfipática con una región hidrófoba a lo largo de un lado. Esta región hidrófoba proporciona un área para la dimerización, permitiendo que los motivos se "juntan como en una cremallera" entre sí. Las cremalleras de leucina son normalmente de 20 a 40 aminoácidos de longitud, por ejemplo de aproximadamente 30 aminoácidos.

- 40 Las cremalleras de leucina normalmente están formadas por dos secuencias distintas, por ejemplo, una cremallera de leucina ácida heterodimeriza con una cremallera de leucina básica. Un ejemplo de una cremallera de leucina es el dominio de acoplamiento (DDD1) y el dominio de anclaje (AD1) que se describen con más detalle a continuación.

- 45 Las cremalleras de leucina forman dímeros, mientras que los espaciadores en superhélice de la presente invención forman multímeros (trímeros y superiores). Las cremalleras de leucina se heterodimerizan en la porción de dimerización de la secuencia, mientras que los dominios en superhélice se homodimerizan.

En una realización, la presente invención proporciona un CAR hipersensible.

- 50 El CAR hipersensible se proporciona aumentando la valencia del CAR. En particular, el uso de un dominio espaciador en superhélice que es capaz de interactuar para formar un multímero que comprende más de dos dominios en superhélice y, por lo tanto, más de dos CAR, aumenta la sensibilidad a las dianas que expresan ligandos de baja densidad, debido al aumento del número de ITAM presentes y la avidéz del complejo de CAR oligomérico.

- 55 El presente polipéptido formador de CAR comprende un dominio espaciador en superhélice que permite la multimerización de al menos tres polipéptidos formadores de CAR. En otras palabras, el CAR comprende un dominio en superhélice que es capaz de formar un trímero, un tetrámero, un pentámero, un hexámero o un heptámero de dominios en superhélice.

- 60 Los ejemplos de dominios en superhélice que son capaces de formar multímeros que comprenden más de dos dominios en superhélice incluyen, pero sin limitación, los de la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (POMC), proteína de unión a manosa A, proteína rica en serina en superhélice 1, factor de liberación de polipéptido 2, SNAP-25, SNARE, represor Lac o apolipoproteína E (véanse las SEQ ID NO: 30-42 anteriores).

- 65 El dominio en superhélice puede ser el dominio en superhélice de COMP.

COMP es uno de los complejos proteicos más estables en la naturaleza (estable de 0 °C a 100 °C y un amplio intervalo de pH) y solo se puede desnaturalizar con clorhidrato de guanidina 4-6 M. El dominio en superhélice de COMP es capaz de formar un pentámero. COMP también es una proteína que se expresa de forma endógena que se expresa de manera natural en el espacio extracelular. Esto reduce el riesgo de inmunogenicidad en comparación con los espaciadores sintéticos. Adicionalmente, se ha resuelto la estructura cristalina del motivo en superhélice de COMP, lo que proporciona una estimación precisa de la longitud del separador (Figura 4). La estructura de COMP tiene una longitud de ~ 5,6 nm (en comparación con los dominios bisagra y CH2CH3 de la IgG humana, que son de ~ 8,1 nm).

El dominio en superhélice puede consistir en o comprender la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1 o un fragmento de las misma. SEQ ID NO: 1
DLGPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQVREITFLKNTVMECDACG

Como se muestra en la Figura 11, es posible truncar el dominio en superhélice de COMP en el extremo N y mantener la expresión en superficie. Por lo tanto, el dominio en superhélice puede comprender o consistir en una versión truncada de la SEQ ID NO: 1, que está truncada en el extremo N. La COMP truncada puede comprender los 5 aminoácidos C-terminales de la SEQ ID NO: 1, es decir, la secuencia CDACG. La COMP truncada puede comprender de 5 a 44 aminoácidos, por ejemplo, al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 aminoácidos. La COMP truncada puede corresponder al extremo C de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, una COMP truncado que comprende 20 aminoácidos puede comprender las secuencias QQVREITFLKNTVMECDACG. La COMP truncada puede conservar el resto (o restos) de cisteína implicados en la multimerización. La COMP truncada puede conservar la capacidad de formar multímeros.

Se conocen diversos dominios en superhélice que forman hexámeros, tales como gp41 procedente del VIH, y una proteína artificial designada superhélice hexamérica de descrita por N. Zaccai *et al.* (2011) Nature Chem. Bio., (7) 935-941). Una forma mutante de la cremallera de leucina de GCN4-p1 forma una estructura en superhélice heptamérica (J. Liu *et al.*, (2006) PNAS (103) 15457-15462).

El dominio en superhélice puede comprender una variante de uno de los dominios en superhélice descritos anteriormente, siempre que la secuencia variante conserve la capacidad de formar un oligómero en superhélice. Por ejemplo, el dominio en superhélice puede comprender una variante de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1 o 30 a 42, que tiene al menos el 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad de secuencia, siempre que la secuencia variante conserve la capacidad de formar un oligómero en superhélice.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias polipeptídicas puede determinarse fácilmente por programas tales como BLAST, que está libremente disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

DOMINIO DE UNIÓN A ANTÍGENO

El dominio de unión a antígeno es la porción de un CAR clásico que reconoce el antígeno.

Se conocen en la técnica numerosos dominios de unión a antígeno, entre ellos, los basados en el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, miméticos de anticuerpos y receptores de linfocitos T. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede comprender: un fragmento variable monocatenario (scFv) procedente de un anticuerpo monoclonal; un ligando natural del antígeno diana; un péptido con suficiente afinidad por la diana; un ligante de dominio único tal como uno de camélido; un ligante artificial solo, como un Darpin; o una cadena sencilla procedente de un receptor de linfocitos T.

Se conocen diversos antígenos asociados a tumor (AAT), como se muestra a continuación en la Tabla 1. El dominio de unión a antígeno utilizado en la presente invención puede ser un dominio que sea capaz de unirse a un AAT como se indica en la misma.

Tabla 1

Tipo de cáncer	AAT
Linfoma difuso de linfocitos B grandes	CD19, CD20, CD22
Cáncer de mama	ErbB2, MUC1
LMA	CD13, CD33
Neuroblastoma	GD2, NCAM, ALK, GD2

(continuación)

LLC B	CD19, CD52, CD160
Cáncer colorrectal	Proteína de unión a folato, CA-125
Leucemia linfocítica crónica	CD5, CD19
Glioma	EGFR, Vimentina
Mieloma múltiple	BCMA, CD138
Carcinoma de células renales	Anhidrasa carbónica IX, G250
Cáncer de próstata	PSMA
Cáncer de intestino	A33

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un CAR hipersensible que es capaz de estimular la activación celular en respuesta al antígeno que se expresa en una célula diana a una baja densidad.

- 5 El dominio de unión a antígeno puede unirse a un AAT que se exprese en una célula, por ejemplo una célula cancerosa, a una baja densidad. Un AAT expresado a baja densidad puede referirse, por ejemplo, a un AAT expresado a un nivel de decenas a millares de moléculas por célula.

- 10 Los ejemplos de AAT que se sabe que se expresan a bajas densidades en determinados cánceres, incluyen, pero sin limitación, ROR1 en CLL, Typr-1 en melanoma y BCMA en mieloma.

Los dominios de unión a antígeno (tales como los scFv o los Acm) que se unen a estos AAT se han descrito anteriormente, por ejemplo, como se muestra a continuación en la tabla:

Antígeno asociado a tumor	Dominio de unión a antígeno	Bibliografía
ROR-1	2A2, 2D11	S. Baskar <i>et al.</i> , Landes Bioscience, vol. 4, (3) 349-361, R12, R11, Y31 (J. Yang <i>et al.</i> , PLOSone, vol. 6, (6), e21018, 2011
Typr-1	TA99	P. Boross <i>et al.</i> , Immunology Letters, vol. 160, (2), 151-157, 2014
BCMA	C12A3.2 y C11D5.3	R. Carpenter <i>et al.</i> , Clin Cancer Res., vol. 19, (8) 2048-2060, 2013), J6M0 (Y. Tai <i>et al.</i> , Blood, vol 123, (20), 3128-3138, 2014

15 DOMINIO TRANSMEMBRANA

El dominio transmembrana es la secuencia de un CAR que se extiende por la membrana. Puede comprender una hélice alfa hidrófoba. El dominio transmembrana puede proceder de CD28, que da una buena estabilidad al receptor.

20 PÉPTIDO SEÑAL

Los polipéptidos formadores de CAR y/o polipéptidos accesorios pueden comprender un péptido señal de modo que cuando se expresan en una célula, tal como un linfocito T, la proteína naciente se dirija al retículo endoplásmico y posteriormente a la superficie celular, donde se expresa.

30 El núcleo del péptido señal puede contener un largo tramo de aminoácidos hidrófobos que tiene tendencia a formar una única hélice alfa. El péptido señal puede empezar con un tramo corto de aminoácidos con carga positiva, lo que ayuda a reforzar la topología apropiada del polipéptido durante la translocación. Al final del péptido señal normalmente hay un tramo de aminoácidos que reconoce y escinde la peptidasa señal. La peptidasa señal puede escindir durante o después de acabada la translocación, para generar un péptido señal libre y una proteína madura. Después, los péptidos señal libres se digieren por proteasas específicas.

35 El péptido señal puede estar en el extremo amino de la molécula.

El péptido señal puede comprender la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 2, 3 o 4, o una variante de la misma que tenga 5, 4, 3, 2 o 1 mutaciones de aminoácido (inserciones, sustituciones o adiciones), siempre que el péptido señal aún funcione para provocar la expresión del CAR en la superficie celular.

SEQ ID NO: 2: MGTSLLCWMALCLLGADHADG

40 El péptido señal de la SEQ ID NO: 2 es compacto y altamente eficaz y procede de la cadena beta del TCR. Se predice que proporcione aproximadamente un 95 % de escisión después de la glicina terminal, proporcionando una eliminación eficaz por la peptidasa señal.

SEQ ID NO: 3: MSLPVTALLPLALLLHAARP

45 El péptido señal de la SEQ ID NO: 3 procede de la IgG1.
SEQ ID NO: 4: MAVPTQVLGLLLWLTDARC

El péptido señal de la SEQ ID NO: 4 procede de la CD8a.

ENDODOMINIO

- 5 El endodominio es la porción de un CAR clásico que se encuentra en el lado intracelular de la membrana.

El endodominio es la porción de transmisión de señales de un CAR clásico. Después del reconocimiento del antígeno por parte del dominio de unión a antígeno, un grupo de moléculas CAR individuales, los CD45 y CD148 nativos, se excluyen de la sinapsis y se transmite una señal a la célula.

- 10 El endodominio de un CAR de espaciador en superhélice puede ser o comprender un dominio de señalización intracelular. En una realización alternativa, el endodominio del presente CAR puede ser capaz de interactuar con una molécula de señalización intracelular que está presente en el citoplasma, lo que conduce a la señalización.

- 15 El dominio de señalización intracelular o la molécula de señalización intracelular separada puede ser o comprender un dominio de señalización de linfocitos T.

- 20 El dominio de señalización utilizado de forma más habitual es el del endodominio de CD3-zeta, que contiene 3 ITAM. Este transmite una señal de activación al linfocito T después de que se una al antígeno. CD3-zeta puede no proporcionar una señal de activación completamente competente y podría ser necesaria una señalización coestimuladora adicional. Por ejemplo, pueden utilizarse CD28 y OX40 quiméricos con CD3-Zeta para transmitir una señal proliferativa/de supervivencia, o pueden usarse los tres juntos (ilustrado en la Figura 1B).

- 25 El presente CAR puede comprender el endodominio de CD3-Zeta solo, el endodominio de CD3-Zeta con el de CD28 u OX40 o el endodominio de CD28 y el endodominio de OX40 y de CD3-Zeta (Figura 1).

El endodominio puede comprender uno o más de los siguientes: un endodominio de ICOS, un endodominio de CD27, un endodominio de BTLA, un endodominio de CD30, un endodominio de GITR y un endodominio de HVEM.

- 30 El endodominio puede comprender la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 5 a 13 o una variante de la misma que tiene al menos el 80 % de identidad de secuencia.

SEQ ID NO: 5 - endodominio de CD3 Z

- 35 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 6 - endodominios de CD28 y CD3 Zeta

- 40 SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 7 - CD28, endodominios de OX40 y CD3 Zeta

- 45 SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

- 50 SEQ ID NO: 8 - endodominio de ICOS
CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL

SEQ ID NO: 9 - endodominio de CD27
QRRKYRSNKGESPVPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP

- 55 SEQ ID NO: 10 - endodominio de BTLA

RRHQGKQNELSDTAGREINLVD AHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEE
NKP GIVYASLNH SVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS

- 60 SEQ ID NO: 11 - endodominio de CD30

HRRACRKIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAY
LESPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEA
DHTPHYEQETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK

- 65

SEQ ID NO: 12 - endodominio de GTR
QLGLHIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRLGDLWV

SEQ ID NO: 13 - endodominio de HVEM
CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFTGRSPNH

Una secuencia variante puede tener al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 a 13, siempre que la secuencia proporcione un dominio de señalización intracelular eficaz.

RECEPTOR QUIMÉRICO PARA ANTÍGENO (CAR)

En un aspecto, la presente invención proporciona un CAR multimérico que comprende uno o más polipéptidos formadores de CAR de acuerdo con la invención junto con uno o más polipéptidos accesorios, comprendiendo el o cada polipéptido accesorio (i) un dominio espaciador en superhélice; (ii) un dominio transmembrana; y (iii) un endodominio en donde el número total de polipéptidos formadores de CAR y polipéptidos accesorios en el CAR multimérico es de al menos tres.

El polipéptido formador de CAR proporciona el dominio de unión a antígeno y, por lo tanto, la especificidad antigénica.

El polipéptido accesorio proporciona un endodominio adicional que puede utilizarse para generar una respuesta de señalización deseada. Esto es ventajoso con respecto a un dominio de señalización compuesto, ya que cada dominio de señalización permanece sin que otros dominios de señalización lo estorben.

Además, permite que cada dominio de señalización se localice en una proximidad óptima a la membrana para la señalización.

El endodominio del polipéptido formador de CAR puede comprender al menos un primer dominio de señalización intracelular; y el endodominio del polipéptido accesorio puede comprender al menos un segundo dominio de señalización intracelular. Por ejemplo, uno de los endodominios del polipéptido formador de CAR y el polipéptido accesorio puede comprender un endodominio de CD3 zeta y el otro endodominio del CAR y el polipéptido accesorio puede comprender un endodominio de 41BB.

En otra realización, la presente invención proporciona un CAR multimérico de acuerdo con la presente invención, que comprende adicionalmente un segundo polipéptido accesorio que comprende: (i) un dominio en superhélice; (ii) un dominio transmembrana; y (iii) un endodominio; en donde el dominio en superhélice del segundo polipéptido accesorio es capaz de interactuar con los dominios en superhélice del polipéptido formador de CAR y el primer polipéptido accesorio.

El endodominio del polipéptido formador de CAR puede comprender al menos un primer dominio de señalización intracelular, el endodominio del primer polipéptido accesorio puede comprender al menos un segundo dominio de señalización intracelular y el endodominio del segundo polipéptido accesorio puede comprender al menos un tercer dominio de señalización intracelular.

Por ejemplo, los endodominios del CAR, el primer polipéptido accesorio y el segundo polipéptido accesorio pueden comprender entre ellos un endodominio de CD3 zeta; un endodominio de 41BB; y un endodominio de CD28.

La presente invención también proporciona un polipéptido accesorio adecuado para su uso en un CAR como se describe en el presente documento.

CAR MULTIMÉRICO

La presente invención proporciona un CAR multimérico que comprende una pluralidad de polipéptidos formadores de CAR de acuerdo con la presente invención, y opcionalmente un polipéptido (o polipéptidos) accesorio que forma un complejo debido a las interacciones entre los dominios espaciadores en superhélice.

El CAR multimérico puede ser, por ejemplo, trimérico, tetramérico, pentamérico, hexamérico o heptamérico.

El número de polipéptidos formadores de CAR frente al de proteínas accesorias en cada tipo de CAR se resume en las siguientes tablas:

CAR trimérico:

Número de polipéptidos formadores de CAR	Número de polipéptidos accesorios
1	2

(continuación)

2	1
3	0

CAR tetramérico:

Número de polipéptidos formadores de CAR	Número de polipéptidos accesorios
1	3
2	2
3	1
4	0

Car pentamérico:

Número de polipéptidos formadores de CAR	Número de polipéptidos accesorios
1	4
2	3
3	2
4	1
5	0

5 La asociación de polipéptidos formadores de CAR y de polipéptidos accesorios dentro de una célula será aleatoria, de forma que las opciones proporcionadas en las tablas anteriores pueden referirse a un único CAR multimérico, en el que se puede definir con precisión el número de polipéptidos formadores de CAR y de polipéptidos accesorios, o el número promedio de polipéptidos formadores de CAR y de polipéptidos accesorios en CAR multiplexados expresados en una célula. En sistemas donde hay una alta relación de polipéptido accesorio:polipéptido formador de CAR, es posible que se expresen en la superficie celular algunos múltiplex de polipéptido accesorio solo. Esto no es un problema, siempre que al menos algunos de los múltiplex expresados en la superficie celular comprendan un polipéptido formador de CAR.

15 La pluralidad de polipéptidos formadores de CAR y opcionalmente de polipéptido (o polipéptidos) accesorio puede comprender el mismo endodominio.

20 Como alternativa, la pluralidad de polipéptidos formadores de CAR y opcionalmente de polipéptido (o polipéptidos) accesorio puede comprender endodominios distintos. De esta forma, se pueden activar múltiples endodominios distintos de forma simultánea. Esto es ventajoso con respecto a un dominio de señalización compuesto, ya que cada dominio de señalización permanece sin que otros dominios de señalización lo estorben. Además, permite que cada dominio de señalización se localice en una proximidad óptima a la membrana para la señalización.

25 Cuando un CAR multimérico comprende una pluralidad de dominios de unión a antígeno, esto aumentará la avidéz de la unión al antígeno. El CAR multimérico puede imitar la unión al antígeno por parte de una IgM, la cual comprende una disposición pentamérica o hexamérica de inmunoglobulinas.

SISTEMA DE SEÑALIZACIÓN DE CAR

30 En el presente documento se describe un sistema de señalización del receptor quimérico para antígeno (CAR), que comprende:

- 35 (i) un CAR multimérico que comprende un polipéptido formador de CAR o polipéptido accesorio como se define anteriormente, que comprende un primer dominio de heterodimerización; y
(ii) un componente de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización y un segundo dominio de heterodimerización;

40 en donde la heterodimerización entre el primer y segundo dominios de heterodimerización provoca que el CAR multimérico y el componente de señalización formen un complejo de CAR funcional.

Cada polipéptido (o polipéptidos) formador de CAR o polipéptido (o polipéptidos) accesorio puede comprender una pluralidad de dominios de heterodimerización, de forma que un único polipéptido formador de CAR o polipéptido accesorio es capaz de heterodimerizarse con una pluralidad de componentes de señalización. Un ejemplo de tal sistema se ilustra en la Figura 15.

45 Para aumentar el dominio de señalización: el dominio de unión a antígeno, aún más, cada componente de señalización, puede comprender una pluralidad de dominios de señalización.

50 La heterodimerización puede producirse solo en presencia de una molécula pequeña, por ejemplo, utilizando un sistema tal como el descrito en el documento WO2016/030691.

Alternativamente, la heterodimerización puede producirse de forma espontánea. El primer y el segundo dominio de heterodimerización son capaces de dimerizarse entre sí de forma espontánea. La heterodimerización se produce solo con el primer y segundo dominios de heterodimerización, sin la necesidad de ninguna molécula separada que actúe como un "inductor" de la dimerización.

El sistema de señalización de la presente divulgación no está limitado por la disposición de una pareja específica de dominios de heterodimerización. El componente de direccionamiento (es decir, el CAR multimérico) puede comprender cualquier dominio de una pareja de dominios de heterodimerización, siempre que el componente de señalización comprenda el correspondiente dominio complementario que permite que el componente de direccionamiento y el componente de señalización colocalicen en la membrana celular.

Los dominios de heterodimerización para su uso en el presente sistema CAR no están limitados a los que interactúan en una relación de 1:1. Por ejemplo, los dominios de heterodimerización pueden interactuar para formar multímeros (por ejemplo, trímeros o tetrámeros). Los dominios pueden interactuar de una manera que un primer dominio de heterodimerización único colocalice con múltiples (por ejemplo, 2 o 3) segundos dominios de heterodimerización. En el presente documento puede ser ventajoso tener un dominio de señalización que comprenda el segundo dominio de heterodimerización, de forma que múltiples componentes de señalización pueden colocalizar con un único CAR multimérico. Esto puede ser ventajoso, por ejemplo, cuando se precisa un alto nivel de señalización al unirse el antígeno al CAR multimérico.

El CAR multimérico puede comprender una pluralidad de dominios de heterodimerización, de forma que interactúe con una pluralidad de componentes de señalización. Por ejemplo, el CAR multimérico puede comprender más de dos dominios de heterodimerización, tal como 3 a 10 dominios de heterodimerización. La Figura 15 muestra un CAR multimérico que comprende 20 dominios de heterodimerización, cuatro por polipéptido formador de CAR/polipéptido accesorio.

Por conveniencia, la expresión dominio de heterodimerización se usa en el presente documento para todos los dominios que median la colocalización del CAR multimérico y los componentes de señalización.

En la técnica se conoce una gran diversidad de dominios de heterodimerización apropiados, de los cuales se proporcionan en el presente documento ejemplos de los mismos.

El primer y segundo dominios de heterodimerización pueden ser cremalleras de leucina.

Las cremalleras de leucina son bien conocidas en la técnica (véase Hakoshima; Encyclopedia of Life Sciences; 2005, por ejemplo). La cremallera de leucina es una estructura súper secundaria que funciona como dominios de dimerización. Su presencia genera fuerzas de adhesión en hélices alfa paralelas. Una única cremallera de leucina consta de múltiples restos de leucina a intervalos de aproximadamente 7 restos, que forma una hélice alfa anfipática con una región hidrófoba a lo largo de un lado. Esta región hidrófoba proporciona un área para la dimerización, permitiendo que los motivos se "junten como en una cremallera" entre sí. Las cremalleras de leucina son normalmente de 20 a 40 aminoácidos de longitud, por ejemplo de aproximadamente 30 aminoácidos.

El primer y/o segundo dominio de heterodimerización puede comprender la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 43 o 44. El primer dominio de heterodimerización puede comprender la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 43 y el segundo dominio de heterodimerización puede comprender la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 44, o viceversa.

SEQ ID NO: 43: QLEKELQALEKENAQLWELQALEKELAQ

SEQ ID NO: 44: QLEKKLQALKKKNAQLKWKLQALKKKLAQ

En determinadas realizaciones, los primero y segundo dominios de heterodimerización pueden ser cremalleras de leucina ácidas (por ejemplo, la SEQ ID NO: 43) o básicas (por ejemplo, la SEQ ID NO: 44). En particular, cuando el primer dominio de heterodimerización es una cremallera de leucina ácida, la segunda heterodimerización es una cremallera de leucina básica, y viceversa.

El primer y segundo dominio de heterodimerización pueden ser el dominio de dimerización y acoplamiento (DDD1) y el dominio de anclaje (AD1). Estos dominios y la interacción entre ellos son conocidos en la técnica (Rossi *et al.*; PNAS; 2006; 103(18); 6841-6846).

DDD1 es una estructura en hélice alfa corta procedente de la proteína quinasa A (PKA). AD1 es una estructura en hélice alfa corta procedente de las proteínas de anclaje de la quinasa A (las AKAP).

El dominio DDD1 puede comprender la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 45.

SEQ ID NO: 45: SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA

El dominio AD1 puede comprender la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 46
SEQ ID NO: 46: VQIEYLAKQIVDNAIQQA

Dado que la interacción DDD1/AD1 es trimérica, un dominio AD1 presente en el endodominio del CAR reunirá tres dominios de señalización que comprenden un dominio de DDD1. Por lo tanto, en una realización particular, el endodominio del CAR comprende un dominio de AD1 y el componente de señalización intracelular comprende un dominio DDD1.

Los dominios de heterodimerización pueden proceder de la ribonucleasa bacteriana (Barnasa) y de péptidos Barnstar.

La Barnasa es la proteína ribonucleasa de *Bacillus amyloliquefaciens*. Está compuesta por 110 aminoácidos. Barnstar funciona para inhibir la actividad nucleasa de la Barnasa y, por lo tanto, se une a Barnstar con una afinidad muy alta (una tasa de activación de 108 s⁻¹ M⁻¹).

Los dominios de heterodimerización pueden proceder de ARNasas pancreáticas humanas y de péptido S.

Las ARNasas pancreáticas humanas son endonucleasas específicas de pirimidina. El péptido S es el fragmento proteolítico enzimáticamente inactivo de la ARNasa A, que carece del sitio de unión a ARN.

La presente divulgación también abarca variantes de las secuencias de heterodimerización descritas en el presente documento que conservan la capacidad de dimerizar con el dominio de heterodimerización correspondiente. El dominio de heterodimerización puede ser una variante que tiene 5, 4, 3, 2 o 1 mutaciones de aminoácido (inserciones, sustituciones o adiciones) o al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia en comparación con la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 43, 44, 45 o 46, siempre que sigan provocando la heterodimerización entre el CAR y el componente de señalización.

ÁCIDO NUCLEICO

La presente invención proporciona adicionalmente un ácido nucleico que codifica el polipéptido formador de CAR y/o un polipéptido accesorio como se define en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, los términos "polinucleótido", "nucleótido" y "ácido nucleico" pretenden ser sinónimos entre sí.

Un experto en la materia entenderá que numerosos polinucleótidos y ácidos nucleicos distintos pueden codificar el mismo polipéptido, como resultado de la degeneración del código genético. Además, debe entenderse que las personas expertas pueden, utilizando técnicas de rutina, hacer sustituciones de nucleótidos que no afecten a la secuencia de polipéptido codificada por los polinucleótidos descritos en este caso, para reflejar el uso de codones de cualquier organismo hospedador particular en el que se han de expresar los polipéptidos.

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención pueden comprender ADN o ARN. Pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Además, pueden ser polinucleótidos que incluyan dentro de ellos nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conocen varios tipos distintos de modificación de oligonucleótidos. Estas incluyen esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato, adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines del uso como se describe en el presente documento, debe entenderse que los polinucleótidos pueden modificarse por cualquier método disponible en la técnica. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo para potenciar *in vivo* la actividad o vida útil de polinucleótidos de interés.

Los términos "variante", "homólogo" o "derivado" en relación con una secuencia de nucleótidos incluye cualquier sustitución de, variación de, modificación de, reemplazo de, delección de o adición de un (o más) ácido nucleico de o en la secuencia.

En el presente documento se describe una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido accesorio adecuado para su uso en el CAR de acuerdo con la invención.

CONSTRUCCIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO

La presente invención también proporciona una construcción de ácido nucleico que codifica una pluralidad de secuencias de ácido nucleico.

Por ejemplo, la construcción de ácido nucleico puede codificar dos o más polipéptidos formadores de CAR como se define en el presente documento.

En esta realización, la construcción de ácido nucleico puede comprender al menos dos secuencias de ácido nucleico:

- (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido formador de CAR; y

(ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido formador de CAR.

La construcción de ácido nucleico puede codificar al menos un polipéptido formador de CAR como se define en el primer aspecto de la invención y al menos un polipéptido accesorio como se define anteriormente.

En esta realización, la construcción de ácido nucleico puede comprender al menos dos secuencias de ácido nucleico:

- (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido formador de CAR; y
- (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido accesorio.

La construcción de ácido nucleico puede codificar:

- (i) al menos un polipéptido formador de CAR, que forma un CAR multimérico como se define en la invención; y
- (ii) un componente de señalización intracelular como se define anteriormente.

En esta realización, la construcción de ácido nucleico puede comprender al menos dos secuencias de ácido nucleico:

- (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido formador de CAR; y
- (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un componente de señalización intracelular.

La construcción de ácido nucleico puede comprender una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido accesorio.

Por lo tanto, la construcción de ácido nucleico puede producir dos o más polipéptidos unidos por un sitio (o sitios) de escisión. El sitio de escisión puede ser autoescindible, de modo que cuando se produce el producto de traducción naciente, se escinde inmediatamente en polipéptidos individuales sin la necesidad de ninguna actividad de escisión externa.

El sitio de escisión puede ser cualquier secuencia que permita que el polipéptido que comprende múltiples CAR y/o polipéptidos accesorios se separe.

El término "escisión" se usa en el presente documento por conveniencia, pero el sitio de escisión puede provocar que los péptidos se separen en entidades individuales por un mecanismo que no sea la escisión clásica. Por ejemplo, para el péptido 2A autoescindible del virus de la fiebre aftosa (VFA) (véase más abajo), se han propuesto diversos modelos para dar cuenta de la actividad de "escisión": proteólisis por una proteinasa de la célula hospedadora, autoproteólisis o un efecto traduccional (Donnelly *et al* (2001) J. Gen. Virol. 82:1027-1041). El mecanismo exacto de tal "escisión" no es importante para los fines de la presente invención, siempre y cuando el sitio de escisión, cuando se coloca entre secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas, provoque que las proteínas se expresen como entidades separadas.

El sitio de escisión puede ser un sitio de escisión de furina.

La furina es una enzima que pertenece a la familia de la proproteína convertasa de tipo subtilisina. Los miembros de esta familia son proproteína convertasas que procesan proteínas precursoras latentes en sus productos biológicamente activos. La furina es una serina endoproteasa dependiente de calcio que puede escindir de forma eficaz proteínas precursoras en sus sitios de procesamiento de aminoácidos básicos emparejados. Los ejemplos de sustratos de furina incluyen la hormona paratiroides, el precursor del factor de crecimiento transformante beta 1, la proalbúmina, la pro-beta-secretasa, la metaloproteína de matriz de membrana de tipo 1, la subunidad beta del profactor de crecimiento nervio y el factor de von Willebrand. La furina escinde proteínas justo cadena abajo de una secuencia diana de aminoácidos básicos (canónicamente, Arg-X-(Arg/Lys)-Arg) y está enriquecida en el aparato de Golgi.

El sitio de escisión puede ser un sitio de escisión del virus del grabado del tabaco (VGT).

La proteasa de VGT es una cisteína proteasa altamente específica de secuencia que es una proteasa de tipo quimotripsina. Es muy específica para su sitio de escisión diana y, por lo tanto, se usa con frecuencia para la escisión controlada de proteínas de fusión tanto *in vitro* como *in vivo*. El sitio de escisión del VGT consenso es ENLYFQ\S (donde '\ ' denota el enlace peptídico escindido). Las células de mamífero, tales como las células humanas, no expresan la proteasa de VGT. Por lo tanto, en realizaciones en las que la presente construcción de ácido nucleico comprende un sitio de escisión de VGT y se expresa en una célula de mamífero, la proteasa de VGT exógena también debe expresarse en la célula de mamífero.

El sitio de escisión puede codificar un péptido autoescindible.

Un "péptido autoescindible" se refiere a un péptido que funciona de tal manera que cuando se produce el producto naciente que comprende los polipéptidos y el péptido autoescindible, se "escinde" inmediatamente o se separa en un

primer y segundo polipéptidos distintos y discretos sin la necesidad de ninguna actividad de escisión externa.

El péptido autoescindible puede ser un péptido autoescindible 2A de un aftovirus o un cardiovirus. La escisión primaria 2A/2B de los aftovirus y cardiovirus está mediada por la "escisión" de 2A en su propio extremo C. En los aftovirus, tal como los virus de la fiebre aftosa (VFA) y el virus de la rinitis equina A, la región 2A es una sección corta de aproximadamente 18 aminoácidos, que, junto con el resto N-terminal de la proteína 2B (un resto de prolina conservado) representa un elemento autónomo capaz de mediar la "escisión" en su propio extremo C (Donnelly *et al* (2001), como anteriormente).

Se han descubierto secuencias "similares a 2A" en picornavirus que no sean aftovirus o cardiovirus, virus de insectos 'tipo picornavirus', rotavirus de tipo C y secuencias repetidas dentro de *Trypanosoma* spp, y una secuencia bacteriana (Donnelly *et al* (2001), como anteriormente). El sitio de escisión puede comprender una de estas secuencias de tipo 2A, tal como:

YHADYYKQRLIHDVEMNPGP (SEQ ID NO: 14)
 HYAGYFADLLIHDITNPGP (SEQ ID NO: 15)
 QCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 16)
 ATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 17)
 AARQMLLLSGDVETNPGP (SEQ ID NO: 18)
 RAEGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO: 19)
 TRAEIEDELIRAGIESNPGP (SEQ ID NO: 20)
 TRAEIEDELIRADIESNPGP (SEQ ID NO: 21)
 AKFQIDKILISGDVELNPGP (SEQ ID NO: 22)
 SSIIRTKMLVSGDVEENPGP (SEQ ID NO: 23)
 CDAQRQKLLSGDIEQNPGP (SEQ ID NO: 24)
 YPIDFGGFLVKADSEFNPGP (SEQ ID NO: 25)

El sitio de escisión puede comprender la secuencia de tipo 2A mostrada como la SEQ ID NO: 19 (RAEGRGSLTTCGDVEENPGP).

En el presente documento se describe un kit que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido formador de CAR de acuerdo con la presente invención y/o un polipéptido accesorio adecuado para producir un CAR de acuerdo con la invención.

VECTOR

La presente invención también proporciona un vector, o kit de vectores, que comprende una o más secuencias de ácido nucleico o construcción de ácido nucleico como se define anteriormente. Dicho vector puede usarse para introducir la secuencia (o secuencias) de ácido nucleico en una célula hospedadora, de forma que exprese un polipéptido formador de CAR o un péptido accesorio de acuerdo con la invención y/o un CAR de acuerdo con la invención.

El vector puede, por ejemplo, ser un plásmido o un vector vírico, tal como un vector retrovírico o un vector lentivírico, o un vector basado en transposón o ARNm sintético.

El vector puede ser capaz de transfectar o transducir una célula inmunitaria tal como un linfocito T o un linfocito NK.

CÉLULA

La presente invención también se refiere a una célula, tal como una célula inmunitaria, que comprende un polipéptido formador de CAR, un CAR, o sistema de señalización de CAR como se describe anteriormente.

La célula puede comprender un ácido nucleico, una construcción de ácido nucleico o un vector de la presente invención.

La célula puede ser una célula inmunitaria, en particular una célula inmune citolítica, tal como un linfocito T o un linfocito NK.

Las células T o los linfocitos T son un tipo de linfocito que desempeñan un papel central en la inmunidad mediada por células. Se pueden distinguir de otros linfocitos, tales como los linfocitos B y los linfocitos citolíticos naturales (linfocitos NK), por la presencia de un receptor de linfocitos T (TCR) en la superficie celular. Hay diversos tipos de linfocitos T, tal como se resume a continuación.

Los linfocitos T auxiliares (linfocitos TH) ayudan a otros leucocitos en los procesos inmunológicos, incluyendo la maduración de linfocitos B en células plasmáticas y linfocitos B de memoria, y la activación de linfocitos T citotóxicos y macrófagos. Los linfocitos TH expresan CD4 en su superficie. Los linfocitos TH se activan cuando las moléculas

MHC de clase II les presentan antígenos peptídicos en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Estas células pueden diferenciarse en uno de varios subtipos, entre ellos TH1, TH2, TH3, TH17, Th9 o TFH, que secretan distintas citocinas para facilitar distintos tipos de respuestas inmunitarias.

- 5 Los linfocitos T citolíticos (linfocitos TC o CTL) destruyen las células infectadas por virus y células tumorales, y también están implicados en el rechazo de trasplantes. Los CTL expresan el CD8 en su superficie. Estas células reconocen sus dianas al unirse al antígeno asociado con el MHC clase I, que está presente en la superficie de todas las células nucleadas. A través de la IL-10, la adenosina y otras moléculas secretadas por los linfocitos T reguladores, las células CD8⁺ pueden inactivarse a un estado anérgico, que previene enfermedades autoinmunitarias tales como la
- 10 encefalomiелitis autoinmunitaria experimental.

- Los linfocitos T de memoria son un subconjunto de linfocitos T específicos de antígeno que persisten a largo plazo después de que se resuelve una infección. Se expanden rápidamente hasta un gran número de linfocitos T efectores tras la reexposición a su antígeno afín, proporcionando así al sistema inmunitario "memoria" contra infecciones
- 15 pasadas. Los linfocitos T de memoria comprenden tres subtipos: linfocitos T de memoria central (linfocitos TCM) y dos tipos de linfocitos T de memoria efectores (linfocitos TEM y linfocitos TEMRA). Los linfocitos de memoria pueden ser CD4⁺ o CD8⁺. Los linfocitos T de memoria normalmente expresan la proteína de la superficie celular CD45RO.

- Los linfocitos T reguladores (linfocitos Treg), anteriormente conocidos como linfocitos T supresores, son cruciales para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Su función principal es detener la inmunidad mediada por linfocitos T hacia el final de una reacción inmunitaria y suprimir linfocitos T autorreactivos que escaparon al proceso de selección
- 20 negativa en el timo.

- Se han descrito dos clases principales de linfocitos Treg CD4⁺, los linfocitos Treg de origen natural y los linfocitos Treg adaptativos.
- 25

- Los linfocitos Treg de origen natural (también conocidos como linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) surgen en el timo y se han relacionado con interacciones entre los linfocitos T en desarrollo y las células dendríticas mieloides (CD11c⁺) y plasmacitoides (CD123⁺) que se han activado con LET. Los linfocitos Treg de origen natural se pueden distinguir de
- 30 otros linfocitos T por la presencia de una molécula intracelular llamada FoxP3. Las mutaciones del gen FOXP3 pueden prevenir el desarrollo de linfocitos T reguladores, provocando la enfermedad autoinmunitaria letal IPEX.

- Los linfocitos Treg adaptativos (también conocidos como linfocitos Tr1 o linfocitos Th3) pueden originarse durante una respuesta inmunitaria normal.
- 35

- La célula puede ser un linfocito citolítico natural (o linfocito NK). Los linfocitos NK forman parte del sistema inmunitario innato. Los linfocitos NK proporcionan respuestas rápidas a las señales innatas de las células infectadas por virus de manera independiente del MHC

- 40 Los linfocitos NK (que pertenecen al grupo de las células linfoides innatas) se definen como linfocitos granulares grandes (LGG) y constituyen el tercer tipo de células diferenciadas del progenitor linfoide común que genera linfocitos B y T. Se sabe que los linfocitos NK se diferencian y maduran en la médula ósea, el ganglio linfático, el bazo, las amígdalas y el timo, donde luego entran en la circulación.

- 45 Las células CAR de la invención pueden ser cualquiera de los tipos de células mencionados anteriormente.

- Los linfocitos T o NK que expresan un CAR de acuerdo con la invención, o componentes de la misma, se pueden crear *ex vivo* ya sea a partir de la propia sangre periférica del paciente (1^{er} grupo), o en el contexto de un trasplante de células madre hematopoyéticas de sangre periférica del donante (2^o grupo), o de sangre periférica de un donante no
- 50 relacionado (3^{er} grupo).

- Como alternativa, Los linfocitos T o NK que expresan un CAR de acuerdo con la invención, o componentes de los mismos, pueden obtenerse de la diferenciación *ex vivo* de células progenitoras inducibles o células progenitoras embrionarias a linfocitos T o NK. Como alternativa, se puede usar una línea de linfocitos T inmortalizada que conserva su función lítica y pueda actuar como un agente terapéutico.
- 55

- En todas estas realizaciones, las células CAR se generan mediante la introducción de ADN o ARN que codifica el CAR de la invención o un componente (o componentes), o un componente de los mismos, por uno de muchos medios, entre ellos la transducción con un vector vírico, la transfección con ADN o ARN.
- 60

- La célula CAR de la invención puede ser un linfocito T o NK *ex vivo* de un sujeto. El linfocito T o NK puede ser de una muestra de células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Los linfocitos T o NK pueden activarse y/o expandirse antes de su transducción con el ácido nucleico que codifica las moléculas que proporcionan el CAR de la invención o un componente (o componentes) del CAR, por ejemplo, mediante tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-CD3.
- 65

El linfocito T o NK de la invención puede fabricarse mediante:

(i) aislamiento de una muestra que contiene linfocitos T o NK procedente de un sujeto u otras fuentes enumeradas anteriormente; y

5 (ii) transducción o transfección de los linfocitos T o NK con una o más secuencias de ácido nucleico o construcciones de ácido nucleico como se describe anteriormente.

Después, los linfocitos T o NK pueden purificarse, por ejemplo, seleccionado basándose en la expresión del dominio de unión a antígeno del polipéptido de unión a antígeno.

10 COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene una pluralidad de células que expresan el CAR de acuerdo con la invención o los componentes de las mismas.

15 La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Dicha formulación puede, por ejemplo, estar en una forma adecuada para infusión intravenosa.

20 MÉTODO DE TRATAMIENTO

El presente documento se describe un método para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad que comprende la etapa de administrar las células de la presente invención (por ejemplo, en una composición farmacéutica como se describe anteriormente) a un sujeto.

25 Un método para el tratamiento de una enfermedad se refiere al uso terapéutico de las células de la presente invención. En el presente documento, las células se pueden administrar a un sujeto que tenga una enfermedad o afección existente para disminuir, reducir o mejorar al menos un síntoma asociado con la enfermedad y/o para frenar, reducir o bloquear la progresión de la enfermedad.

30 El método para la prevención de una enfermedad se refiere al uso profiláctico de las células de la presente invención. En el presente documento, tales células se pueden administrar a un sujeto que aún no ha contraído la enfermedad y/o que no muestra ningún síntoma de la enfermedad, para prevenir o afectar a la causa de la enfermedad, o para reducir o prevenir el desarrollo de al menos un síntoma asociado con la enfermedad. El sujeto puede tener una predisposición 35 o puede creerse que está en riesgo de desarrollar la enfermedad.

El método puede implicar las etapas de:

40 (i) aislar una muestra que contiene linfocitos T o NK;
(ii) transducir o transfectar tales células con una secuencia de ácido nucleico, construcción de ácido nucleico o vector de la presente invención;
(iii) administrar las células de (ii) a un sujeto.

45 La muestra que contiene linfocitos T o NK puede aislarse de un sujeto o de otras fuentes, por ejemplo como se describe anteriormente. Los linfocitos T o NK pueden aislarse de la propia sangre periférica del sujeto (1^{er} grupo), o en el contexto de un trasplante de células madre hematopoyéticas de sangre periférica del donante (2^o grupo), o de sangre periférica de un donante no relacionado (3^{er} grupo).

50 La presente invención proporciona una célula CAR de la presente invención, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

La divulgación también se refiere al uso de una célula CAR de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

55 La enfermedad a tratar y/o prevenir mediante los métodos de la presente invención puede ser una enfermedad cancerosa, tal como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (células renales), leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de tiroides.

60 Las células CAR de la presente invención pueden ser capaces de destruir células diana, tales como células cancerosas. La célula diana puede ser reconocible por la expresión de un AAT, por ejemplo, la expresión de un AAT proporcionado anteriormente en la Tabla 1.

65 Las células CAR de la presente invención pueden ser capaces de destruir células diana, tales como células cancerosas, que expresan una baja densidad del AAT. Los ejemplos de AAT que se sabe que se expresan a bajas densidades en determinados cánceres, incluyen, pero sin limitación, ROR1 en CLL, Typr-1 en melanoma y BCMA en

mieloma.

Las células CAR y las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse para el tratamiento y/o prevención de las enfermedades descritas anteriormente.

Las células CAR y las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse en cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

La invención se describirá adicionalmente a continuación por medio de Ejemplos, que pretenden servir para ayudar a un experto en la materia a poner en práctica la invención y de ninguna manera pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Expresión de CAR con COMP en la superficie celular

Se transdujo una línea de linfocitos T murina con el CAR con COMP anti-CD33 (secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 5c y secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 5d) o CAR con IgG1 anti-CD33.

Después, estas células se tiñeron con CD33 quimérico soluble fusionado con Fc de IgG2a murino, antes de una tinción secundaria con anti-IgG de ratón PE (Figura 6a)

Se transdujo una línea de linfocitos T murina con el CAR CAR con COMP anti-ROR-1 (secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 5c y secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 5d) o CAR con IgG1 anti-ROR-1.

Después, estas células se tiñeron con ROR-1 soluble etiquetado con His seguido de una tinción secundaria con anti-His-biotina y después una tercera tinción con estreptavidina-APC (Figura 6b).

Los cuatro CAR se expresaron con éxito en la superficie celular. Estos datos también demuestran que el dominio de unión del CAR está orientado de una manera que no impide la unión de ligando cuando se une a un espaciador COMP.

Ejemplo 2 - Estimulación de linfocitos T CAR con COMP con ligando inmovilizado

Se utilizaron linfocitos T con perlas recubiertas con ligando inmovilizado para estimular los linfocitos T CAR con COMP para ROR-1. Para conseguir esto, se construyó y expresó ROR-1 soluble con etiqueta His. Después, los sobrenadantes que conteniendo estos ligandos solubles se incubaron a diversas concentraciones con un número establecido de perlas anti-His. Después, se lavaron las perlas para eliminar el ligando no unido y estas perlas se usaron para estimular los linfocitos T transducidos con los planteamientos de CAR con COMP o un CAR equivalente con un espaciador de IgG.

Los linfocitos T murinos transducidos se cocultivaron con perlas anti-His que se recubrieron previamente con distintas concentraciones de sobrenadante de ROR-1 marcado con His soluble. Se analizó a través de ELISA la cantidad de IL-2 en el sobrenadante del cocultivo después de 16-24 horas (Figura 7).

Ejemplo 3 - Niveles de expresión de células diana con ROR-1

La línea celular SKW expresa bajos niveles de ROR-1 de forma natural. Estas células se transdujeron con ROR-1 para aumentar los niveles de expresión. Estas células se tiñeron con anti-ROR-1 APC y se compararon con células no teñidas (Figura 8).

Ejemplo 4 - Estimulación de linfocitos T CAR con COMP anti-ROR-1 con células SKW positivas para ROR-1

Los linfocitos T murinos transducidos (descritos en los Ejemplos 1 y 2) se cocultivaron con células diana SKW que expresan el ligando ROR-1 en una densidad baja o alta. Los linfocitos T se mantuvieron en un número constante y las células diana se variaron. Se analizó a través de ELISA la cantidad de IL-2 en el sobrenadante del cocultivo después de 16-24 horas (Figura 9).

Se detectaron niveles más altos de IL-2 cuando los linfocitos T CAR con COMP anti-ROR-1 se cocultivaron con células diana SKW que expresaban una baja densidad de ligando ROR-1, en comparación con el CAR con IgG1 anti-ROR-1.

Ambos CAR fueron capaces de iniciar una respuesta de activación con células diana SKW altas.

Ejemplo 5 - Truncamiento del espaciador COMP

El CAR aROR-1 con un espaciador COMP se truncó de su longitud original de 45 aminoácidos. Estas construcciones con COMP truncado se transfectaron en células 293T y después se tiñeron para la expresión en superficie de CAR

con ROR-1s His, seguido de anti-His-Biotina seguido de estreptavidina-PE.Cy7. Estos linfocitos también se tiñeron para el marcador RQR8 con un anticuerpo anti-CD34-FITC. Estas gráficas de FACS muestran una expresión en superficie estable de diversas formas truncadas del espaciador COMP, presentando la capacidad de variar la longitud del espaciador en superhélice de uno a unos pocos aminoácidos a la vez (Figura 11).

Ejemplo 6 - Comparación de los CAR con espaciador en superhélice multiméricos con un CAR dimérico clásico

Para comparar la función de los CAR con espaciadores en superhélice de la invención con un CAR convencional, se fabricaron una serie de construcciones con los mismos dominios de unión a antígeno y endodominios equivalentes, pero con distintos espaciadores, lo que conduce a una estructura de CAR completamente distinta. Los distintos CAR se muestran en la Figura 12.

Todos los CAR comprendían un dominio de unión a antígeno anti-CD19 basado en fmc63 y un endodominio de "segunda generación" que comprendía los endodominios de 41BB y CD3zeta. Se analizaron los siguientes formatos:

- a) un CAR heteromultimérico que comprende: un polipéptido que tiene un dominio de unión a antígeno anti-CD19; un dominio espaciador en superhélice y un endodominio de CD3zeta; y un polipéptido accesorio que tiene un dominio espaciador en superhélice y un endodominio de 41BB (Figura 12A);
- b) un CAR homomultimérico compuesto por polipéptidos que comprenden un dominio de unión a antígeno anti-CD19; un dominio espaciador en superhélice y un endodominio combinado de 41BB/CD3zeta (Figura 12B); y
- c) un CAR homodimérico clásico de segunda generación que comprende dos polipéptidos que tienen un dominio de unión a antígeno anti-CD19, un dominio espaciador del tallo de CD8 y un endodominio combinado de 41BB/CD3zeta (Figura 12C).

Los vectores que codifican el CAR ilustrado en la Figura 12 fueron retrovirus pseudotipados RD114 que codificaban las diversas estructuras CAR.

Se empobrecieron las células que expresaban CD56 en los linfocitos T y se cocultivaron con un número igual de SupT1 para lograr una relación efector:diana de 1:1. Antes del análisis por citometría de flujo, se añadió a cada cocultivo un número igual de perlas de recuento fluorescentes, para permitir la normalización de los números de células y para tener en cuenta cualquier diferencia en los volúmenes de absorción. La citotoxicidad mediada por CAR se evaluó mediante citometría de flujo de la siguiente manera: los linfocitos T se diferenciaron de las células tumorales mediante tinción para la expresión de CD3 frente a FCS y se identificaron las células tumorales por su falta de CD3 y una mayor señal de FCS. La viabilidad se evaluó mediante tinción con colorante 7-AAD de exclusión de células muertas y las células viables se definieron como las que no captaron el colorante. Se enumeraron las células tumorales viables para cada condición de cocultivo y se calculó el porcentaje de citotoxicidad normalizando el número de células tumorales viables con respecto a las recuperadas de los cocultivos llevados a cabo con CMSP no transducidas (100 %). En los días 2 y 5 se evaluó la destrucción de las células diana.

Los resultados se muestran en la Figura 13 (día 2) y la Figura 14 (día 5). Después de dos días, las tres estructuras CAR mostraron destrucción de las células diana Supt1 CD19+. Los dos CAR multiméricos mostraron una destrucción superior al CAR homodimérico clásica equivalente. El CAR homomultimérico (Fmc63-COMP-41BBz) mostró la mayor destrucción. El día 5, algunas células diana residuales permanecían con el CAR homodimérico clásico (Fmc63-talloCD8-41BBz) pero las células diana viables fueron prácticamente indetectables en cuanto a ambos CAR multiméricos.

Ejemplo 7 - Producción y análisis de los SuperCAR en superhélice

Un desafío importante para las tecnologías CAR es la detección de antígenos que están presentes a bajas densidades en las células diana. Para abordar este problema, los presentes inventores han diseñado "SuperCAR" basados en el formato de espaciador en superhélice que reúnen múltiples cadenas de TCRzeta para cada interacción con el antígeno.

La parte intracelular del polipéptido que forma la estructura CAR en superhélice comprende una pluralidad de dominios de heterodimerización, que es capaz, cada uno, de interactuar con uno o más componentes de señalización intracelular que comprenden uno o más dominios de señalización intracelular.

En las construcciones ilustradas en la Figura 15, la dimerización intracelular se encuentra entre el dominio de dimerización y acoplamiento (DDD1) y el dominio de anclaje (AD1). Cada polipéptido que forma el CAR con espaciador en superhélice comprende cuatro dominios AD1 separados. Por lo tanto, un CAR en superhélice que comprende 5 polipéptidos comprenderá, por lo tanto, 20 dominios AD1

El SuperCAR en superhélice se analizó en combinación con distintos componentes de señalización que tienen 0 o 2 copias del dominio de señalización del TCRzeta. Como DDD1 se une a AD1 con una estequiometría de 2:1, estos dominios de señalización arrojan 0 y 80 copias del dominio TCRzeta, respectivamente, para cada componente de direccionamiento del CAR en superhélice de 5 polipéptidos.

Como control, se utilizó un CAR anti-CD19 homodimérico clásico (Figura 15: aCD19-IgGFc-Z) con el mismo dominio de unión a antígeno.

- 5 La línea de linfocitos T murinos BW5 se transdujo con cada CAR y se expuso a células SupT1 que expresan el antígeno afín (CD19) a distintas concentraciones: baja, media y alta. Estas células SupT1 se diseñaron técnicamente para expresar CD19 a distintos niveles mediante el uso de péptidos señal subóptimos y/o la introducción de motivos de retención citoplasmáticos procedentes de Tyrp-1 (insertado próximo a la membrana) o glucoproteína E3-19k de adenovirus (insertado en el extremo C). Después de la exposición al antígeno se midió la liberación de IL-2.
- 10 Los resultados se muestran en la Figura 16. Se descubrió que la superhélice del superCAR que comprende 80 copias de TCR zeta por CAR en superhélice de 5 meros proporcionó una respuesta mucho mayor al antígeno que el CAR clásico equivalente que comprende dos copias de TCR zeta por molécula.
- 15 Aunque la presente invención se ha descrito en relación con realizaciones preferentes específicas, debe entenderse que la invención según se reivindica no debe considerarse limitada indebidamente a tales realizaciones específicas.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> UCL Business PLC

<120> RECEPTOR QUIMÉRICO PARA ANTÍGENO

<130> P106296PCT

25 <150> GB 1504840.8
<151> 23/03/2015

<160> 48

30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 45

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio en superhélice

40 <400> 1

Asp	Leu	Gly	Pro	Gln	Met	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Glu	Thr	Asn	Ala	Ala
1				5					10					15	

Leu	Gln	Asp	Val	Arg	Glu	Leu	Leu	Arg	Gln	Gln	Val	Arg	Glu	Ile	Thr
			20					25					30		

Phe	Leu	Lys	Asn	Thr	Val	Met	Glu	Cys	Asp	Ala	Cys	Gly
		35					40					45

45 <210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> péptido señal procedente de la cadena beta del TCR

<400> 2

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

Asp His Ala Asp Gly
20

<210> 3
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido señal procedente de IgG1
<400> 3

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

His Ala Ala Arg Pro
20

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido señal procedente de CD8a
<400> 4

Met Ala Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys
20

<210> 5
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> endodominio de CD3 Z

<400> 5

ES 2 773 527 T3

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

100

105

110

<210> 6

<211> 152

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> endodominios de CD28 y CD3 Zeta

<400> 6

ES 2 773 527 T3

Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro
1				5					10					15	
Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro
			20					25					30		
Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala
		35					40					45			
Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu
	50					55					60				
Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly
65					70					75					80
Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu
				85					90					95	
Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser
			100					105					110		
Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly
		115					120					125			
Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu
	130					135					140				
His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg								
145					150										

<210> 7
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> endodominios de CD28, OX40 y CD3 Zeta

<400> 7

ES 2 773 527 T3

Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro
1				5					10					15	
Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro
			20					25					30		
Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Pro	Asp
		35					40					45			
Ala	His	Lys	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Pro	Ile	Gln	Glu
	50					55					60				
Glu	Gln	Ala	Asp	Ala	His	Ser	Thr	Leu	Ala	Lys	Ile	Arg	Val	Lys	Phe
65					70					75					80
Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu
				85					90					95	
Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp
			100					105					110		
Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys
		115					120					125			
Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala
	130					135					140				
Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys
145					150					155					160
Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr
				165					170					175	
Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg				
			180					185							

<210> 8
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> endodominio de ICOS

<400> 8

ES 2 773 527 T3

Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn
1 5 10 15

Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg
20 25 30

Leu Thr Asp Val Thr Leu
35

<210> 9
<211> 48
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> endodominio CD27

<400> 9

Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro
1 5 10 15

Ala Glu Pro Cys His Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr
20 25 30

Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro
35 40 45

<210> 10
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> endodominio de BTLA

<400> 10

ES 2 773 527 T3

Arg Arg His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr Ala Gly Arg
1 5 10 15

Glu Ile Asn Leu Val Asp Ala His Leu Lys Ser Glu Gln Thr Glu Ala
20 25 30

Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu Thr Gly Ile Tyr
35 40 45

Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly Ser Glu Val
50 55 60

Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile Val Tyr Ala
65 70 75 80

Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Pro Asn Ser Arg Leu Ala Arg Asn
85 90 95

Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val Arg Ser
100 105 110

<210> 11

<211> 188

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> endodominio CD30

<400> 11

ES 2 773 527 T3

His	Arg	Arg	Ala	Cys	Arg	Lys	Arg	Ile	Arg	Gln	Lys	Leu	His	Leu	Cys			
1				5					10					15				
Tyr	Pro	Val	Gln	Thr	Ser	Gln	Pro	Lys	Leu	Glu	Leu	Val	Asp	Ser	Arg			
			20					25					30					
Pro	Arg	Arg	Ser	Ser	Thr	Gln	Leu	Arg	Ser	Gly	Ala	Ser	Val	Thr	Glu			
		35					40					45						
Pro	Val	Ala	Glu	Glu	Arg	Gly	Leu	Met	Ser	Gln	Pro	Leu	Met	Glu	Thr			
	50					55					60							
Cys	His	Ser	Val	Gly	Ala	Ala	Tyr	Leu	Glu	Ser	Leu	Pro	Leu	Gln	Asp			
65					70					75					80			
Ala	Ser	Pro	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Ser	Pro	Arg	Asp	Leu	Pro	Glu	Pro			
				85					90					95				
Arg	Val	Ser	Thr	Glu	His	Thr	Asn	Asn	Lys	Ile	Glu	Lys	Ile	Tyr	Ile			
			100					105					110					
Met	Lys	Ala	Asp	Thr	Val	Ile	Val	Gly	Thr	Val	Lys	Ala	Glu	Leu	Pro			
		115					120					125						
Glu	Gly	Arg	Gly	Leu	Ala	Gly	Pro	Ala	Glu	Pro	Glu	Leu	Glu	Glu	Glu			
	130					135					140							
Leu	Glu	Ala	Asp	His	Thr	Pro	His	Tyr	Pro	Glu	Gln	Glu	Thr	Glu	Pro			
145					150					155					160			
Pro	Leu	Gly	Ser	Cys	Ser	Asp	Val	Met	Leu	Ser	Val	Glu	Glu	Glu	Gly			
				165					170					175				
Lys	Glu	Asp	Pro	Leu	Pro	Thr	Ala	Ala	Ser	Gly	Lys							
			180					185										

<210> 12

<211> 58

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> endodominio de G1TR

10

<400> 12

ES 2 773 527 T3

Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro
1 5 10 15

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

Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu
35 40 45

Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp Val
50 55

<210> 13
<211> 60
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> endodominio de HVEM

<400> 13

Cys Val Lys Arg Arg Lys Pro Arg Gly Asp Val Val Lys Val Ile Val
1 5 10 15

Ser Val Gln Arg Lys Arg Gln Glu Ala Glu Gly Glu Ala Thr Val Ile
20 25 30

Glu Ala Leu Gln Ala Pro Pro Asp Val Thr Thr Val Ala Val Glu Glu
35 40 45

Thr Ile Pro Ser Phe Thr Gly Arg Ser Pro Asn His
50 55 60

<210> 14
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de tipo 2A

<400> 14

Tyr His Ala Asp Tyr Tyr Lys Gln Arg Leu Ile His Asp Val Glu Met
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
20

<210> 15
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de tipo 2A

5 <400> 15

His Tyr Ala Gly Tyr Phe Ala Asp Leu Leu Ile His Asp Ile Glu Thr
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
20

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de tipo 2A

15

<400> 16

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
20

20

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia de tipo 2A

<400> 17

30

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn
1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Secuencia de tipo 2A

40

<400> 18

Ala Ala Arg Gln Met Leu Leu Leu Leu Ser Gly Asp Val Glu Thr Asn
1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 19
 <211> 20
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de tipo 2A

 10 <400> 19

 Arg Ala Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu
 1 5 10 15

 Asn Pro Gly Pro
 20

 15 <210> 20
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Secuencia de tipo 2A

 <400> 20

 Thr Arg Ala Glu Ile Glu Asp Glu Leu Ile Arg Ala Gly Ile Glu Ser
 1 5 10 15

 Asn Pro Gly Pro
 20

 25 <210> 21
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Secuencia de tipo 2A

 <400> 21

 35 Thr Arg Ala Glu Ile Glu Asp Glu Leu Ile Arg Ala Asp Ile Glu Ser
 1 5 10 15

 Asn Pro Gly Pro
 20

 40 <210> 22
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de tipo 2A

 45 <400> 22

ES 2 773 527 T3

Ala Lys Phe Gln Ile Asp Lys Ile Leu Ile Ser Gly Asp Val Glu Leu
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
20

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de tipo 2A

<400> 23

Ser Ser Ile Ile Arg Thr Lys Met Leu Val Ser Gly Asp Val Glu Glu
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
20

<210> 24

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de tipo 2A

<400> 24

Cys Asp Ala Gln Arg Gln Lys Leu Leu Leu Ser Gly Asp Ile Glu Gln
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
20

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de tipo 2A

<400> 25

Tyr Pro Ile Asp Phe Gly Gly Phe Leu Val Lys Ala Asp Ser Glu Phe
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
20

<210> 26

<211> 647

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del ORF del CAR con COMP anti-CD33

<400> 26

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

Asp His Ala Asp Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Ser Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser
35 40 45

Thr Asn Val Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser
50 55 60

Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro
65 70 75 80

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
85 90 95

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
100 105 110

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
115 120 125

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg
130 135 140

Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Arg Ala Glu
145 150 155 160

ES 2 773 527 T3

Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
 165 170 175
 Pro Met Ala Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu
 180 185 190
 Thr Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 195 200 205
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu
 210 215 220
 Asp Ile Tyr Phe Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 225 230 235 240
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro
 245 250 255
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile
 260 265 270
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr
 275 280 285
 Lys Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 290 295 300
 Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 305 310 315 320
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 325 330 335
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 340 345 350
 Ser Gly Phe Thr Leu Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala
 355 360 365
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Leu Asn Gly Gly
 370 375 380
 Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 385 390 395 400
 Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala

ES 2 773 527 T3

[illegible]

<210> 27
<211> 638

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia de aminoácidos del ORF del CAR con COMP anti-ROR-1

<400> 27

```

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
1          5          10          15

Asp His Ala Asp Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly
          20          25          30

Gly Gly Gly Ser Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser
          35          40          45

Thr Asn Val Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser
          50          55          60

Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro
65          70          75          80

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
          85          90          95

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
          100          105          110

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
          115          120          125

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg
          130          135          140

Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Arg Ala Glu
145          150          155          160

Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
          165          170          175

Pro Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val
          180          185          190

Pro Gly Ser Thr Gly Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Asp Leu Val
          195          200          205

Thr Pro Ala Gly Asn Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Ser Asp

```

ES 2 773 527 T3

210		215		220
Ile Asn Asp Tyr Pro Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly				
225		230		235 240
Leu Glu Trp Ile Gly Phe Ile Asn Ser Gly Gly Ser Thr Trp Tyr Ala				
		245		250 255
Ser Trp Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val				
		260		265 270
Asp Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Phe				
		275		280 285
Cys Ala Arg Gly Tyr Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Phe Asn Ile Trp Gly				
		290		295 300
Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly				
305		310		315 320
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro				
		325		330 335
Ser Ser Thr Ser Gly Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln				
		340		345 350
Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro				
		355		360 365
Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser				
		370		375 380
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr				
385		390		395 400
Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Arg Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys				
		405		410 415
Leu Gly Gly Val Gly Asn Val Ser Tyr Arg Thr Ser Phe Gly Gly Gly				
		420		425 430
Thr Glu Val Val Val Lys Arg Ser Asp Pro Ala Gly Ser Asp Leu Gly				
		435		440 445
Pro Gln Met Leu Arg Glu Leu Gln Glu Thr Asn Ala Ala Leu Gln Asp				
		450		455 460

ES 2 773 527 T3

Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val Arg Glu Ile Thr Phe Leu Lys
465 470 475 480

Asn Thr Val Met Glu Cys Asp Ala Cys Gly Ser Gly Lys Lys Asp Pro
485 490 495

Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
500 505 510

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Arg Val
515 520 525

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
530 535 540

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
545 550 555 560

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
565 570 575

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
580 585 590

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
595 600 605

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
610 615 620

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
625 630 635

<210> 28

<211> 1944

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de ADN del ORF del CAR con COMP anti-CD33

10

<400> 28

atgggcacca gcctgctgtg ctggatggcc ctgtgcctgc tgggcgccga ccacgccgat	60
gcctgcccct acagcaaccc cagcctgtgc agcggaggcg gcggcagcga gctgcccacc	120
cagggcacct tctccaacgt gtccaccaac gtgagcccag ccaagcccac caccaccgcc	180
tgctcttatt ccaatccttc cctgtgtagc ggagggggag gcagcccagc cccagacct	240
cccaccccag ccccaccat cgccagccag cctctgagcc tgagaccga ggcctgccgc	300

ES 2 773 527 T3

```

ccagccgccg gcggcgccgt gcacaccaga ggcctggatt tcgcctgcga tatctacatc 360
tgggcccccac tggccggcac ctgtggcggtg ctgctgctga gcctgggtgat caccctgtac 420
tgcaaccacc gcaaccgcag gcgcgtgtgc aagtgcccca ggcccgtggt gagagccgag 480
ggcagaggca gcctgctgac ctgcggcgac gtggaggaga acccaggccc catggccgtg 540
cccactcagg tcctgggggtt gttgctactg tggcttacag atgccagatg tgacatccag 600
atgacacagt ctccatcttc cctgtctgca tctgtcggag atcgcgtcac catcacctgt 660
cgagcaagtg aggacattta ttttaattta gtgtgggtatc agcagaaacc aggaaaggcc 720
cctaagctcc tgatctatga taaaaatcgc ttggcagatg gggccccatc acggttcagt 780
ggctctggat ctggcacaca gtatactcta accataagta gcctgcaacc cgaagatttc 840
gcaacctatt attgtcaaca ctataagaat tatccgctca cgttcgggtca ggggaccaag 900
ctggaaatca aaagatctgg tggcggagggt tcaggaggcg gaggcagcgg aggcggtggc 960
tcgggaggcg gaggctcgag atctgagggtg cagttggtgg agtctggggg cggttggtg 1020
cagcctggag ggtccctgag gctctcctgt gcagcctcag gattcactct cagtaattat 1080
ggcatgcact ggatcaggca ggctccagggt aagggtctgg agtgggtctc gtctattagt 1140
cttaatggtg gtagcactta ctatcgagac tccgtgaagg gccgattcac tatctccagg 1200
gacaatgcaa aaagcacccct ctaccttcaa atgaatagtc tgagggccga ggacacggcc 1260
gtctattact gtgcagcaca ggacgcttat acgggaggtt actttgatta ctggggccaa 1320
ggaacgctgg tcacagtctc gtctatggat cccgccggga gcgacctggg ccctcagatg 1380
ctgcgggagc tgaggagagc aaatgccgcc ctgcaggacg tgcgcgagct gctgagacag 1440
cagggtgcggg agattacatt cctgaagaac accgtgatgg agtgcgatgc ctgcggatct 1500
gggaagaagg accccaagtt ctgggtcctg gtgggtgggtg gaggcgtgct ggcctgttac 1560
tctctcctgg tgaccgtggc cttcatcatc ttttgggtgc gctcccgggt gaagttttct 1620
cgctctgccg atgccccagc ctatcagcag ggccagaatc agctgtacaa tgaactgaac 1680
ctgggcaggc gggaggagta cgacgtgctg gataagcgga gaggcagaga ccccagatg 1740
ggcggcaaac cacggcgcaa aaatccccag gagggactct ataacgagct gcagaaggac 1800
aaaatggccg aggcctattc cgagatcggc atgaaggag agagaagacg cggaaagggc 1860
cacgacggcc tgtatcagggt attgtccacc gctacaaaag atacatatga tgccctgcac 1920
atgcaggccc tgccaccag atga 1944

```

<210> 29

<211> 1914

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de ADN del ORF del CAR con COMP anti-ROR-1

<400> 29

atgggcacca gcctgctgtg ctggatggcc ctgtgcctgc tgggcgccga ccacgccgat	60
gcctgcccct acagcaaccc cagcctgtgc agcggaggcg gcggcagcga gctgcccacc	120
cagggcacct tctccaacgt gtccaccaac gtgagcccag ccaagcccac caccaccgcc	180
tgtccttatt ccaatccttc cctgtgtagc ggagggggag gcagcccagc ccccagacct	240
cccaccccag cccccaccat cgccagccag cctctgagcc tgagaccga ggcctgccgc	300
ccagccgccg gcggcgccgt gcacaccaga ggcctggatt tcgcctgcga tatctacatc	360
tgggccccac tggccggcac ctgtggcgtg ctgctgctga gcctggtgat caccctgtac	420
tgcaaccacc gcaaccgcag gcgcgtgtgc aagtgcccca ggcccgtggt gagagccgag	480
ggcagaggca gcctgctgac ctgcggcgac gtggaggaga acccaggccc catggagacc	540
gacaccctgc tgctgtgggt gctgctgctg tgggtgcccg gcagcaccgg ccagagcgtg	600
aaggagagcg agggcgacct ggtgacccca gccggcaacc tgacctgac ctgcaccgcc	660
agcggcagcg acatcaacga ctaccccatc agctgggtgc ggcaggcccc aggcaagggc	720
ctggagtgga tcggcttcat caacagcggc ggcagcacct ggtacgccag ctgggtgaag	780
ggccggttca ccatcagccg gaccagcacc accgtggacc tgaagatgac cagcctgacc	840
accgacgaca ccgccaccta cttctgcgcc agaggctaca gcacctacta cggcgacttc	900
aacatctggg gaccggcac cctggtgacc atcagcagcg gaggcggagg gtctgggggc	960
ggcggtagcg gcggaggagg gagcgagctg gtgatgacct agaccccaag cagcaccagc	1020
ggcggcgtgg gcggcaccgt gaccatcaac tgccaggcca gccagagcat cgacagcaac	1080
ctggcctggt tccagcagaa gcctggccag ccaccacccc tgctgatcta ccgggccagc	1140
aacctggcca gcggcgtgcc cagccggttc agcggcagcc ggagcggcac cgagtacacc	1200
ctgaccatca gcggcgtgca gcgggaggac gccgccacct actactgcct gggcggagtg	1260
ggcaacgtga gctaccggac cagcttcggc ggaggcaccg aggtggtggt gaagcggtcg	1320
gatcccgccg ggagcgacct gggccctcag atgctgcggg agctgcagga gacaaatgcc	1380
gccctgcagg acgtgcgcga gctgctgaga cagcaggtgc gggagattac attcctgaag	1440
aacaccgtga tggagtgcga tgctgcgga tctgggaaga aggacccaa gttctgggtc	1500
ctggtggtgg tgggaggcgt gctggcctgt tactctctcc tggtgaccgt ggccttcac	1560
atcttttggg tgcgctcccg ggtgaagttt tctcgctctg ccgatgcccc agcctatcag	1620
cagggccaga atcagctgta caatgaactg aacctgggca ggcgggagga gtacgacgtg	1680
ctggataagc ggagaggcag agaccccag atgggcggca aaccacggcg caaaaatccc	1740
caggagggac tctataacga gctgcagaag gacaaaatgg ccgaggccta ttccgagatc	1800

ES 2 773 527 T3

ggcatgaagg gagagagaag acgcggaaag ggccacgacg gcctgtatca gggattgtcc 1860
accgctacaa aagatacata tgatgccctg cacatgcagg ccctgccacc caga 1914

<210> 30
<211> 57
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína motora kinesina: homodímero paralelo

<400> 30

Met His Ala Ala Leu Ser Thr Glu Val Val His Leu Arg Gln Arg Thr
1 5 10 15

Glu Glu Leu Leu Arg Cys Asn Glu Gln Gln Ala Ala Glu Leu Glu Thr
20 25 30

Cys Lys Glu Gln Leu Phe Gln Ser Asn Met Glu Arg Lys Glu Leu His
35 40 45

Asn Thr Val Met Asp Leu Arg Gly Asn
50 55

<210> 31
<211> 50
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Antígeno delta de hepatitis D: homodímero paralelo

<400> 31

Gly Arg Glu Asp Ile Leu Glu Gln Trp Val Ser Gly Arg Lys Lys Leu
1 5 10 15

Glu Glu Leu Glu Arg Asp Leu Arg Lys Leu Lys Lys Lys Ile Lys Lys
20 25 30

Leu Glu Glu Asp Asn Pro Trp Leu Gly Asn Ile Lys Gly Ile Ile Gly
35 40 45

Lys Tyr
50

<210> 32
<211> 61
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína nuclear de la RNPp de caja C/D de arqueas: heterodímero antiparalelo

<400> 32

Arg Tyr Val Val Ala Leu Val Lys Ala Leu Glu Glu Ile Asp Glu Ser
1 5 10 15

Ile Asn Met Leu Asn Glu Lys Leu Glu Asp Ile Arg Ala Val Lys Glu
20 25 30

Ser Glu Ile Thr Glu Lys Phe Glu Lys Lys Ile Arg Glu Leu Arg Glu
35 40 45

Leu Arg Arg Asp Val Glu Arg Glu Ile Glu Glu Val Met
50 55 60

5 <210> 33
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Proteína de unión a manosa A: homotrímero paralelo

<400> 33

Ala Ile Glu Val Lys Leu Ala Asn Met Glu Ala Glu Ile Asn Thr Leu
1 5 10 15

Lys Ser Lys Leu Glu Leu Thr Asn Lys Leu His Ala Phe Ser Met
20 25 30

15 <210> 34
<211> 29
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína rica en serina en superhélice 1: homotrímero paralelo

25 <400> 34

Glu Trp Glu Ala Leu Glu Lys Lys Leu Ala Ala Leu Glu Ser Lys Leu
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Lys Lys Leu Glu Ala Leu Glu His Gly
20 25

30 <210> 35
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Factor de liberación de polipéptido 2: Cadena A de heterotrímero antiparalelo

<400> 35

ES 2 773 527 T3

Ile Asn Pro Val Asn Asn Arg Ile Gln Asp Leu Thr Glu Arg Ser Asp
1 5 10 15

Val Leu Arg Gly Tyr Leu Asp Tyr
20

<210> 36

<211> 51

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Factor de liberación de polipéptido 2: Cadena B de heterotrímero antiparalelo

<400> 36

Val Val Asp Thr Leu Asp Gln Met Lys Gln Gly Leu Glu Asp Val Ser
1 5 10 15

Gly Leu Leu Glu Leu Ala Val Glu Ala Asp Asp Glu Glu Thr Phe Asn
20 25 30

Glu Ala Val Ala Glu Leu Asp Ala Leu Glu Glu Lys Leu Ala Gln Leu
35 40 45

Glu Phe Arg
50

<210> 37

<211> 51

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SNAP-25 y SNARE: Cadena A de heterotetrámero paralelo

<400> 37

Ile Glu Thr Arg His Ser Glu Ile Ile Lys Leu Glu Asn Ser Ile Arg
1 5 10 15

Glu Leu His Asp Met Phe Met Asp Met Ala Met Leu Val Glu Ser Gln
20 25 30

Gly Glu Met Ile Asp Arg Ile Glu Tyr Asn Val Glu His Ala Val Asp
35 40 45

Tyr Val Glu
50

<210> 38

<211> 67

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 773 527 T3

<220>

<223> SNAP-25 y SNARE: Cadena B de heterotetrámero paralelo

5 <400> 38

Ala Leu Ser Glu Ile Glu Thr Arg His Ser Glu Ile Ile Lys Leu Glu
1 5 10 15

Asn Ser Ile Arg Glu Leu His Asp Met Phe Met Asp Met Ala Met Leu
20 25 30

Val Glu Ser Gln Gly Glu Met Ile Asp Arg Ile Glu Tyr Asn Val Glu
35 40 45

His Ala Val Asp Tyr Val Glu Arg Ala Val Ser Asp Thr Lys Lys Ala
50 55 60

Val Lys Tyr
65

<210> 39

<211> 69

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SNAP-25 y SNARE: Cadena C de heterotetrámero paralelo

<400> 39

Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser
1 5 10 15

Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp
20 25 30

Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu
35 40 45

Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu
50 55 60

Ala Glu Lys Asn Leu
65

<210> 40

<211> 51

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SNAP-25 y SNARE: Cadena D de heterotetrámero paralelo

<400> 40

ES 2 773 527 T3

Ile Glu Thr Arg His Ser Glu Ile Ile Lys Leu Glu Asn Ser Ile Arg
1 5 10 15

Glu Leu His Asp Met Phe Met Asp Met Ala Met Leu Val Glu Ser Gln
20 25 30

Gly Glu Met Ile Asp Arg Ile Glu Tyr Asn Val Glu His Ala Val Asp
35 40 45

Tyr Val Glu
50

- 5 <210> 41
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Represor Lac: homotetrámero paralelo
<400> 41

Ser Pro Arg Ala Leu Ala Asp Ser Leu Met Gln Leu Ala Arg Gln Val
1 5 10 15

Ser Arg Leu Glu
20

- 15 <210> 42
<211> 136
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> Apolipoproteína E: heterotetrámero antiparalelo
- 25 <400> 42

ES 2 773 527 T3

Ser Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu Gly Arg Phe Trp Asp Tyr Leu
1 5 10 15

Arg Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln Val Gln Glu Glu Leu Leu Ser
20 25 30

Ser Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala Leu Met Asp Glu Thr Met Lys
35 40 45

Glu Leu Lys Ala Tyr Lys Ser Glu Leu Glu Glu Gln Leu Thr Ala Arg
50 55 60

Leu Ser Lys Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ala Asp Met
65 70 75 80

Glu Asp Val Cys Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu Val Gln Ala
85 90 95

Met Leu Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His
100 105 110

Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln
115 120 125

Lys Arg Leu Ala Val Tyr Gln Ala
130 135

<210> 43

<211> 29

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> dominio de heterodimerización

<400> 43

Gln Leu Glu Lys Glu Leu Gln Ala Leu Glu Lys Glu Asn Ala Gln Leu
1 5 10 15

Glu Trp Glu Leu Gln Ala Leu Glu Lys Glu Leu Ala Gln
20 25

15 <210> 44

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> dominio de heterodimerización

<400> 44

ES 2 773 527 T3

Gln Leu Glu Lys Lys Leu Gln Ala Leu Lys Lys Lys Asn Ala Gln Leu
1 5 10 15

Lys Trp Lys Leu Gln Ala Leu Lys Lys Lys Leu Ala Gln
20 25

<210> 45

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio de dimerización y acoplamiento (DDD1)

<400> 45

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

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

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 46

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio de anclaje (AD1)

<400> 46

Val Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln
1 5 10 15

Gln Ala

<210> 47

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> COMP truncada

<400> 47

ES 2 773 527 T3

Gln Gln Val Arg Glu Ile Thr Phe Leu Lys Asn Thr Val Met Glu Cys
1 5 10 15

Asp Ala Cys Gly
20

<210> 48

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> sitio de escisión consenso del virus del grabado del tabaco (VGT)

<400> 48

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser
1 5

15

REIVINDICACIONES

1. Un receptor quimérico para antígeno multimérico (CAR) que comprende al menos tres polipéptidos formadores de CAR, comprendiendo cada polipéptido formador de CAR:

- (i) un dominio de unión a antígeno;
- (ii) un dominio espaciador en superhélice;
- (iii) un dominio transmembrana; y
- (iv) un endodominio.

2. Un receptor quimérico para antígeno multimérico que comprende uno o más polipéptidos formadores de CAR como se define en la reivindicación 1, junto con uno o más polipéptidos accesorios, comprendiendo el o cada polipéptido accesorio:

- (i) un dominio espaciador en superhélice;
- (ii) un dominio transmembrana; y
- (iii) un endodominio

en donde el número total de polipéptidos formadores de CAR y polipéptidos accesorios en el CAR multimérico es de al menos tres.

3. Un CAR multimérico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el dominio espaciador en superhélice procede de: proteína oligomérica de la matriz del cartílago (POMC), proteína de unión a manosa A, proteína rica en serina en superhélice 1, factor de liberación de polipéptido 2, SNAP- 25, SNARE, represor Lac o apolipoproteína E.

4. Un CAR multimérico de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el dominio espaciador en superhélice comprende una de las secuencias mostradas como la SEQ ID NO: 1 o 30 a 42, o un fragmento de la misma o una variante de la misma que tiene al menos el 80 % de identidad de secuencia y conserva la capacidad de formar un oligómero en superhélice.

5. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido formador de CAR como se define en cualquier reivindicación precedente.

6. Una construcción de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido formador de CAR como se define en la reivindicación 1, 3 o 4 y al menos un polipéptido accesorio como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.

7. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 o una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6.

8. Una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 o una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6 y expresa un CAR multimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

9. Una composición farmacéutica que comprende una célula de acuerdo con la reivindicación 8.

10. Una célula de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad.

11. Una célula para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la enfermedad es cáncer.

12. Un método para fabricar una célula de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende la etapa de introducir una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6 o un vector de acuerdo con la reivindicación 7 en una célula *ex vivo*.

FIGURA 1

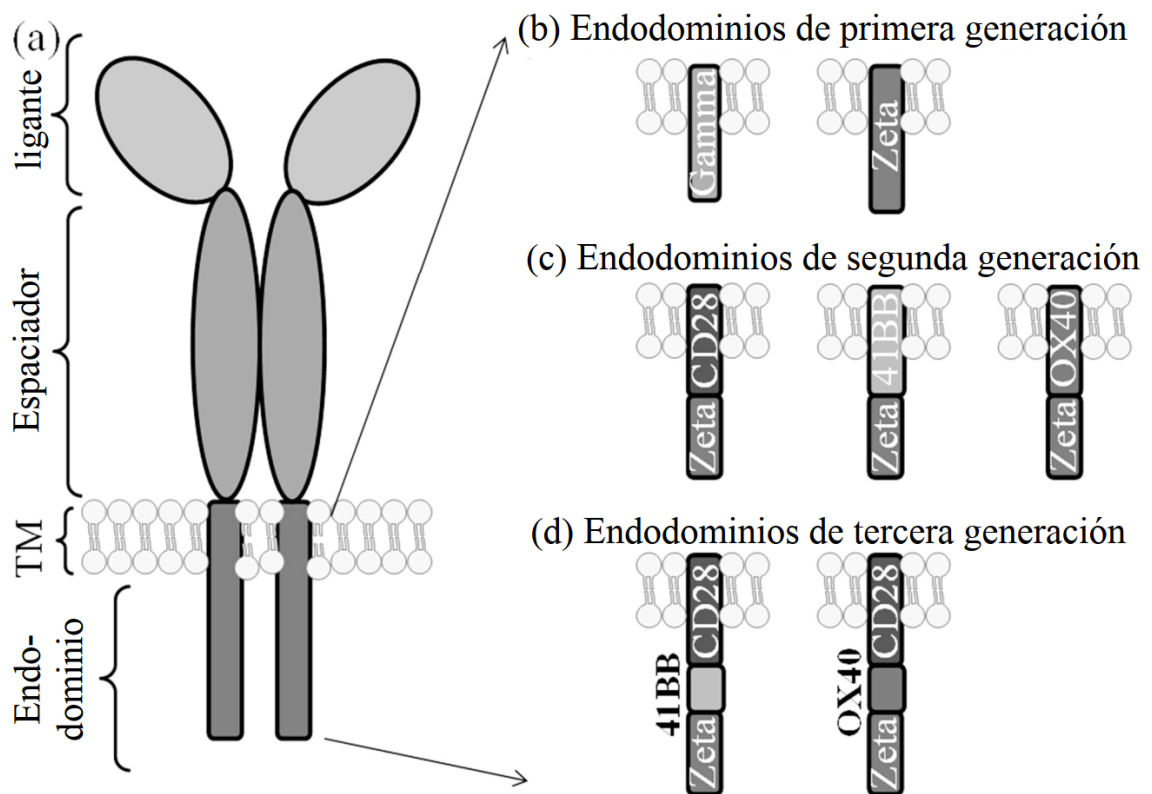
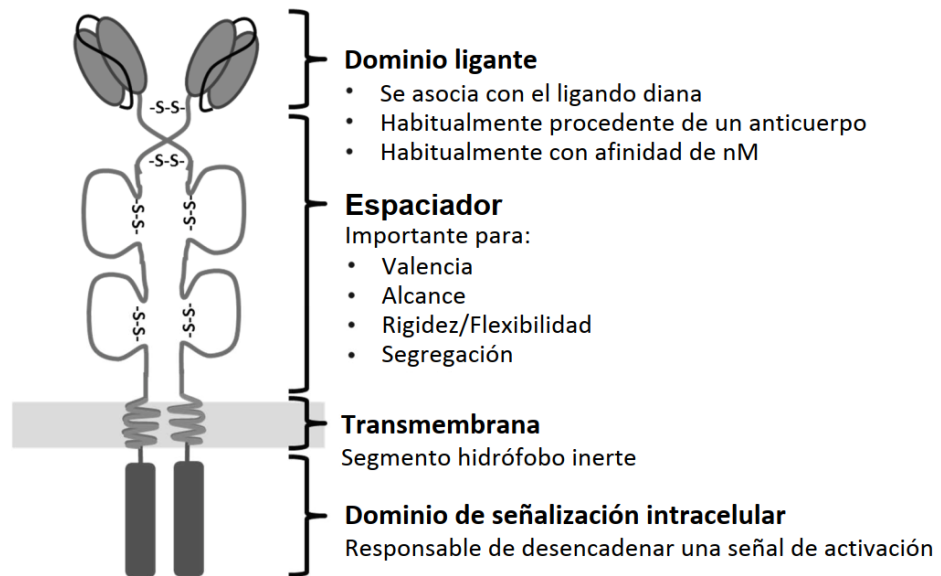


FIGURA 2

A)



B)

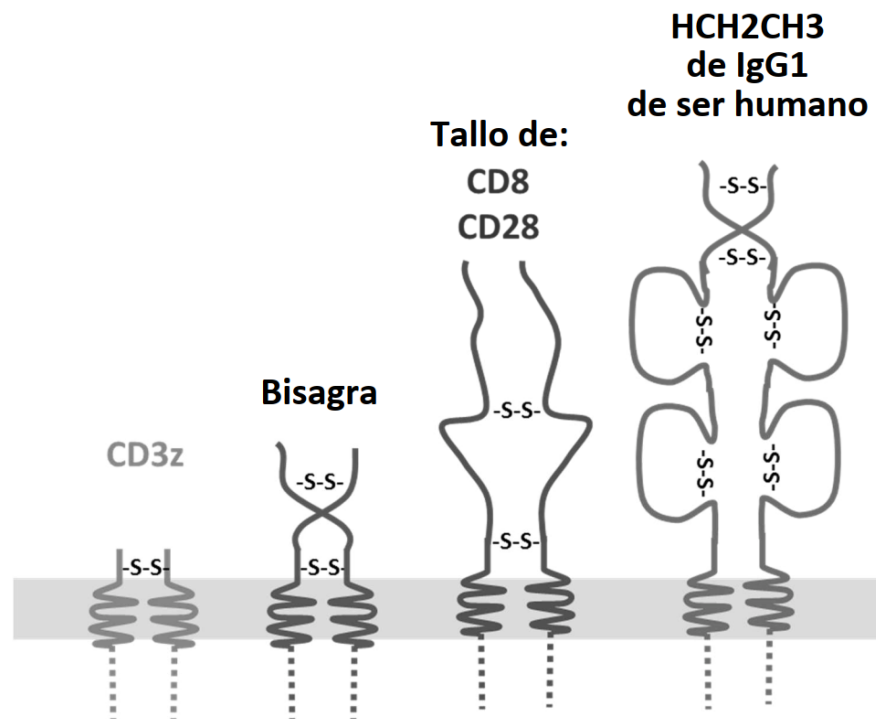


FIGURA 3

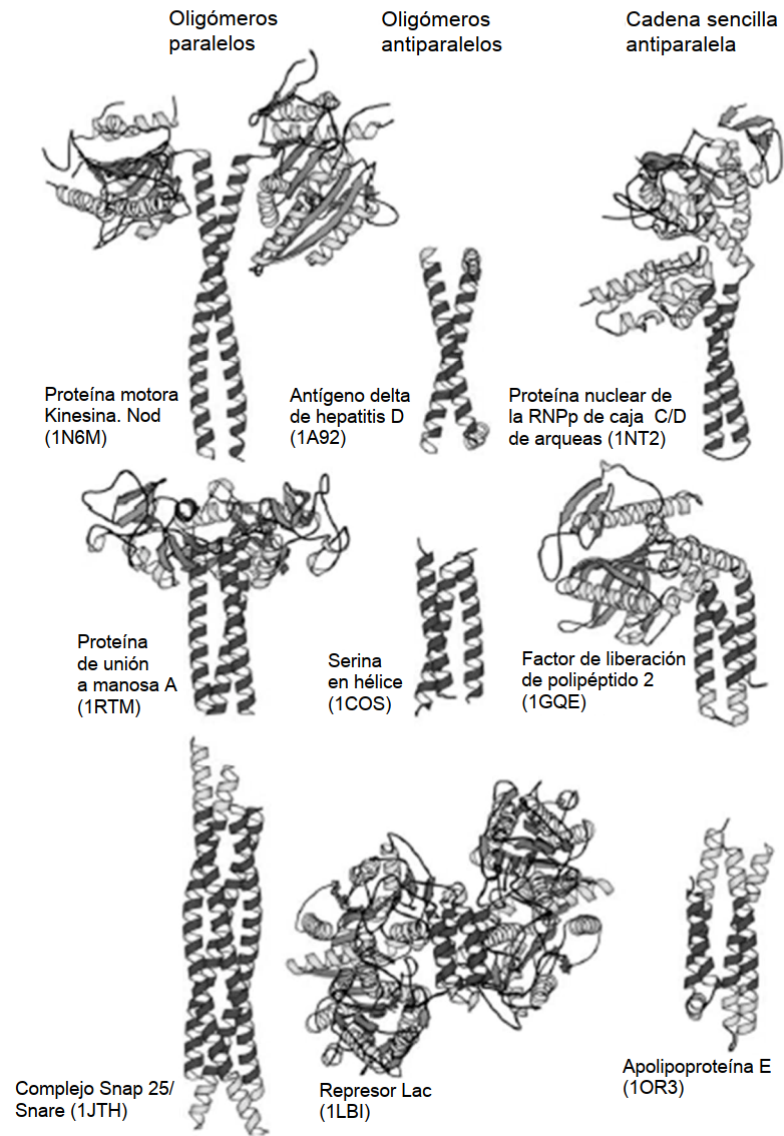


FIGURA 4

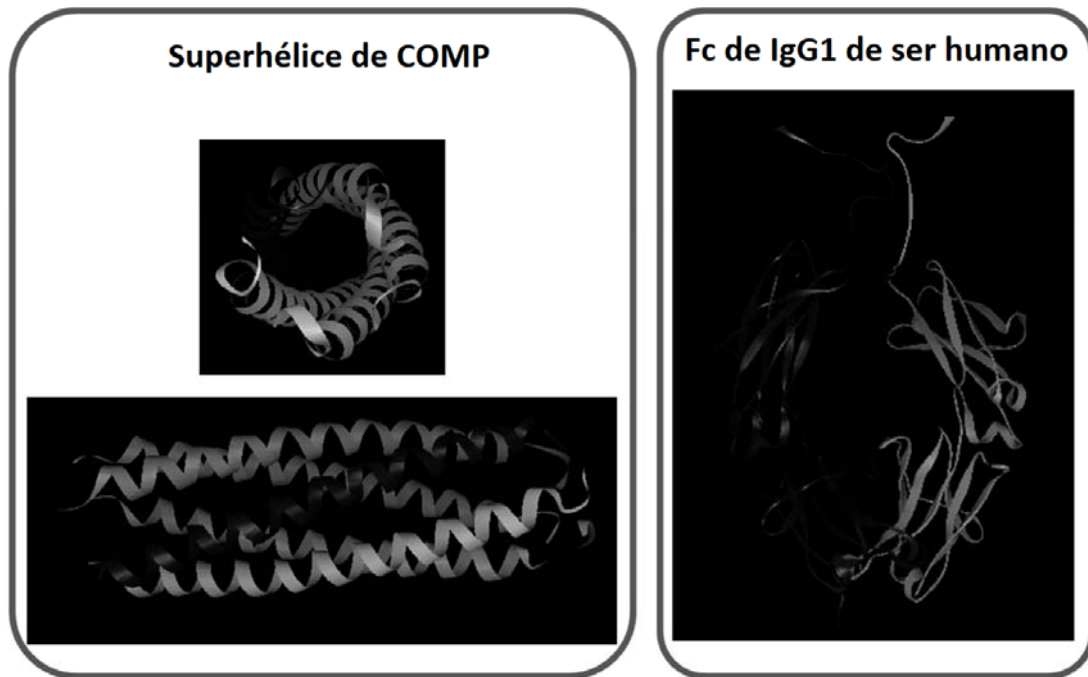


FIGURA 5

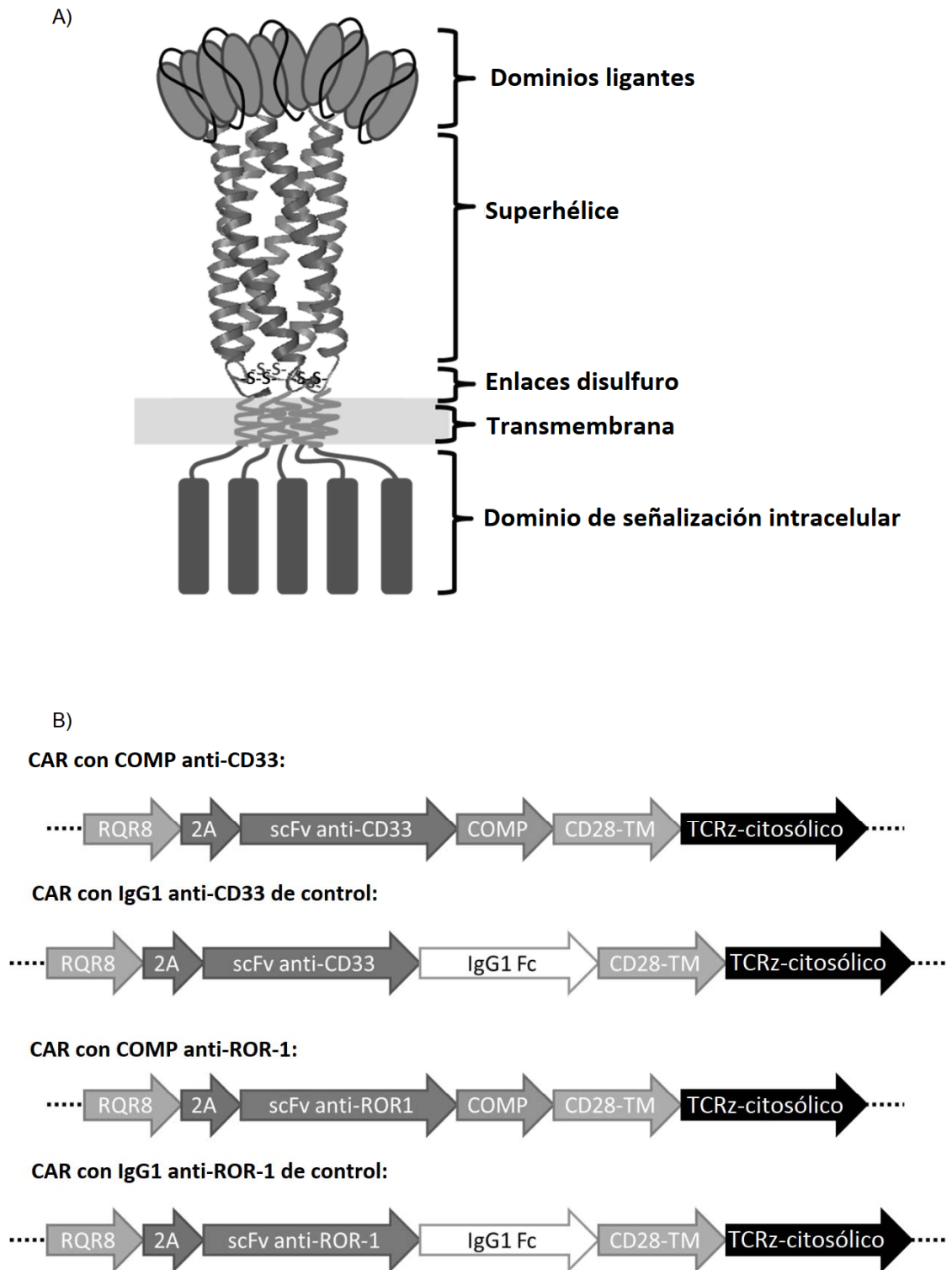


FIGURA 5 - CONTINUACIÓN

C)

**Secuencia de aminoácidos del CAR con COMP anti-CD33 en superhélice
(SEQ ID NO:26)**

MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSCSGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSCSGGGGSPAPRPPTPAPTIA
PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVRAEGRGSLTTCGDVEENPGPMAVP
TQVLGLLLLWLTDAQCIMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYFNLVWYQKPGKAPKLLIYDNRADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISS
LQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTKEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMH
WIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFDYWGQGLTVTVSSMDPA
GSDLGPQMLRELQETNAALQDVRELLRQVREITFLKNTVMECDACGSGKKDPKFWVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSRVKFSRS
ADAPAYQQGQNLQYLNELNLRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGL
STATKDTYDALHMQALPPR

**Secuencia de aminoácidos del CAR con COMP anti-ROR-1 en superhélice
(SEQ ID NO:27)**

MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSCSGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSCSGGGGSPAPRPPTPAPTIA
LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVRAEGRGSLTTCGDVEENPGP
VLLLVWPGSTGQSVKESEGDVTPAGNLTLCTASGSDINDYPISWVRQAPGKGLEWIGFINSGGSTWYASWVKGRFTISRSTTVLKM
TTDDTATYFCARGYSTYYGDFNIWGPGLVTISSGGGSGGGGSGGGGSELVMTQTPSSTSGAVGGTVTINCQASQSIDNLAWFQKPGQ
PPTLLIYRASNLASGVPSRFSGSRSGTEYTLISGVQREDAATYYCLGGVGNVSYRTSFGGGTEVVVKRSDPAGSDLGPQMLRELQETNAALQD
VRELLRQVREITFLKNTVMECDACGSGKKDPKFWVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSRVKFSRSADAPAYQQGQNLQYLNELNLRREE
YDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

FIGURA 5 - CONTINUACIÓN

D) **Secuencia de ADN del CAR con COMP anti-CD33 en superhélice (SEQ ID NO:28)**

ATGGGCACCAGCCTGCTGTGCTGGATGGCCCTGTGCCTGCTGGGCGCGACCAACGCCGATGCCTGCCCTACAGCAACCCACAGCC
TGTGCAGCGGAGAGCGCGGACGCGAGCTGCCACACCAAGGGCACCCTTCTCAACGCTGTCCACCAACGTGAGCCCGACCAAGGCCCA
CCACCAACGCTGTCTTTATTCGAATCTTCTCTGTAGCGAGGGGAGGACGCCACGCCCTCCCAACCTCCCAACCCACAGCCCTCC
ACCATCGCCAGCAGCCTCTGAGCTGTAGACCTGAGACCCGAGGCTTGCGCCACGCCGCCGCGCGCTGCACACCAAGAGGCTGGAT
TTCGCTGCGATATCTACATCTGGGCCCCACTGGCCGGCACCTGTGGCGTGTCTGCTGTGAGCCTGGTGATCACCTGTACTGCA
CCACCGCAACCGCAGCGCGTGTGCAAGTGTCCCAAGCCGCGTGTGTGAGAGCCGAGGGCAGAGGACGCTGTGACCTGTGGCG
ACGTGGAGGAGAAGCCAGGCCCTAGCCCTGCCCTACGCTCTGGGTTGTTGCTACTGTGGCTACAGATGCCAGATGTG
ATTCACAGATGACACAGTCTCATCTTCCCTGTCTGATCTGTGGAGATCGCGTACCATTACCTGTGAGCAAGTAGGACATT
TATTTTAATTTAGTGTGGTATCAGCAGAAAACAGGAAAGGCCCTAAGCTCCTGATCTATGATACAAATCGTTGGCAGATGGG
TCCCATCAGGTTTCAGTGGCTCTGGATCTGGCAGACAGTATACTCTAACCATAGTAGCTGCAACCCGAAGATTTTCGAACCTAT
TATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGCTCAGGTTCCGTCAGGGACCAAGCTGGAATCAAAAGTGTGGTGGCGGAGGGTCA
GGAGGCGGAGGACGCGGAGGCGGTGGCTGAGGAGCGGAGGCTCAGATCTGAGGTGCAGTTGGTGAGTCTGGGGCGCG
TTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCTGTGACGCTCAGGATTCATCTCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGC
AGGCTCAGGGAGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCATTACTATGAGACCTCGGTGAAGGGCC
GATTCATCTATCCAGGACCAATGCAAAAAGCACCTCTACCTTCAAATGAATAGTCTGAGGCGGAGACAGCCGCTCTATTA
CTGTGCAGCAGGACGCTTATACGGGAGGTTACTTTGATTACTGGGGCAGGAAGACGCTGGTACAGTCTCGTCTATGGATCCC
GCCGGGAGCGACCTGGGCCCTCAGATGCTGCGGGAGCTGCAGGAGACAAATGCCGCCCTGCAGGACGTGCGCGAGCTGCTGAG
ACAGAGGCTGCGGGAGATTACATTTCTGAAGAACACCGTGATGGAGTGCATGCTCGGATCTGGGAAGAAAGGACCCCAAGT
TCTGGGCTCTGGGTGGTGGGAGGCGTGTGGCTGTACTCTCTGGTGACCTGGCCTTCATCATCTTTGGTGGCGCTCC
CGGGTGAAGTTTTCTCGCTTGGCAGTCCCAAGCTATCAGCAGGGCAGCAATCAGCTGTACAAAGAACTGAACCTGGGACGGC
GGGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGCGGAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAAACACGGCGCAAAAATCCCCAGGA
GGGACTCTATAACGAGCTGCAGAAAGGACAAAATGGCGAGGCTATTCGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGAAGACGCGGA
AAGGGCCACGACGGCTGTATCAGGGATTGTCCACCGCTACAAAAGATACATATGATGCCCTGCACATGCAGGCCTGCCACCA
GATGA

Secuencia de ADN del CAR con COMP anti-ROR-1 en superhélice (SEQ ID NO:29)

ATGGGACCACGAGCTGCTGTGCTGGATGGCCCTGTGCTGCTGGGCGCCGACCAACGCGGATGCCTGCCCTACAGCAACCCAGCCTGTGCAGCGGAGGCGCGCGGACGAGAGCTGCCACCCAGGGGACCTTCTCAACAGTGTCCACCAAGTGAAGCCAGGCAAGCCACCAACGCTGCCGCTGTCTTATGCTCAATCTCCCTGTGATAGCGGAGGGGAGGCGACCCAGCCCCAGACCTCCCACCCAGCCCCCACCATCGCCAGCCAGCCTGTAGCCTAGACCCGAGGCTCGCCGCCAGCGCGCGGCGGCTGTGACACAGAGCGCTGGAATTTGCGCTGCGATATCTACATCTGGGCCCCACTGGCCGGCACTGTGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTGGTGATCACCTGTACTGCAACCACCGCAACCCGAGGGCGGTGTGCAAGTCCCCAGGCGCGTGGTGAGAGCGGAGGGCAGAGGCAGCCTGTGTACCTGCGGCGACGTGGAGGAGAAACCCAGGCCCATGAGACCGACACCTGCTGTGTGGGTGCTGCTGTGTGGTGCCCGGACGACCGGCGAGCGTGGAAGGAGAGCGAGGGCGAGCTGGTAGCCCGGCAACTGACCTGACCTGACCGGACGGGAGCGACATCAACGACTACCCCTAGCTGGGTGCGCGAGCGCCAGGCAAGGGCTGGAAGTGAGTCGGCTTATCAACAGCGCGGCGAGCAGCTGTTACGCCAGCTGGGTGAAGGGCGGTTACCATCAGCCGAGACGACCAACCGTGGACCTGAAGATGACCAGCCTGACCACCGACGACACCGCCACCTACTTCTCGGCCAGAGGTACAGCACCTACTACGCGCACTTCAACATCTGGGGACCCGGACCTGTGTGACCATCAGCAGCGAGGGCGGAGGGTCTGGGGGCGCGGTGAGCGGCGAGGAGGGAGCGAGCTGGTGATGACCCAGACCCCAAGCAGCACCAGCGCGCTGGGCGGCAACCGTGA

CCATCAACTGCCAGGCCAGGACAGAGCATCGACAGCAACTGCGCTGTTCCAGCAGAAGCTGGCGAGCCACCCACCTGCTGTATCATCTGGGCGCAGAACCTGTGCCAGCGGCGTGCCAGCGCGTTACGCGCAGCGGAGCGACCGAGTACACCTGACCTATCAGCGGCGTGCAGCGGGAGGACCGCCCACTACTACTGCTGGGCGGAGTGGGCAACGTGAGCTACCGGACCAGCTTCGCGGAGGGCACCGAGGTGGTGGTGAAGCGGTGCGATCCCGCGGGAGCGACCTGGGCGCTCAGATGCTGCGGAGCTGCAGGAGACAAATGCCGCTCGCGGCTGCGAGCGCGAGCTGCTGAGACGACAGGTGCGGGAGATTACATCTTGAAGAACACCGTGATGGAGTGCAGTGCTGCGGATGCGAAGGAGGACCAAGTGTGGGTGCTGTGGTGGTGGGAGGCGCTGCGCTGTTACTCTCTGTGTACCGTGGCTGCTCATCATCTTTGGTGCGCTCCGGGTGAAGTATTTCTGCTGCTGCCGATGCCCCAGCTATCAGCAGTCCGCGAGAATCAGCTGTACAATGAACTGAACCTGGGCGAGCGGGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGCGGAGAGGCGAGACCCGAGATGGGCGGCAAAACCGGCGCAAAAATCCCCAGGAGGAGCTCTATAACGAGCTCGAGAGGACAAATGSCCGAGGCGCTATTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGAGAAGCGGGAAGAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGATTGTCCACCGCTACAAAAGATACATATGATGCCCTGCATGCGAGCCCTGCCACCGAA

FIGURA 6

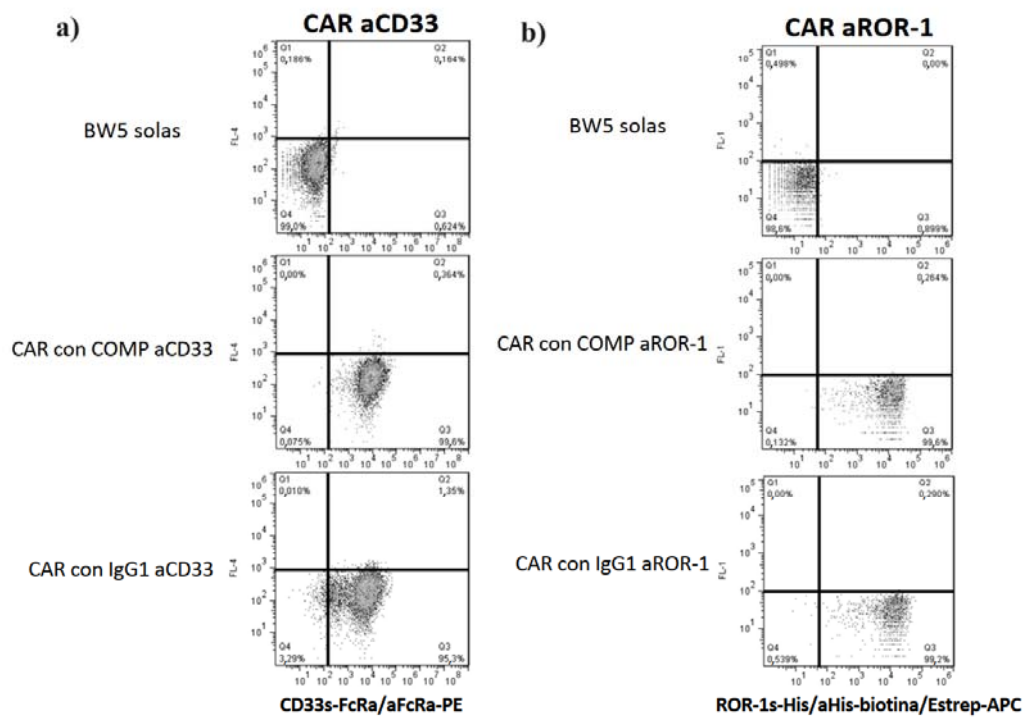


FIGURA 7

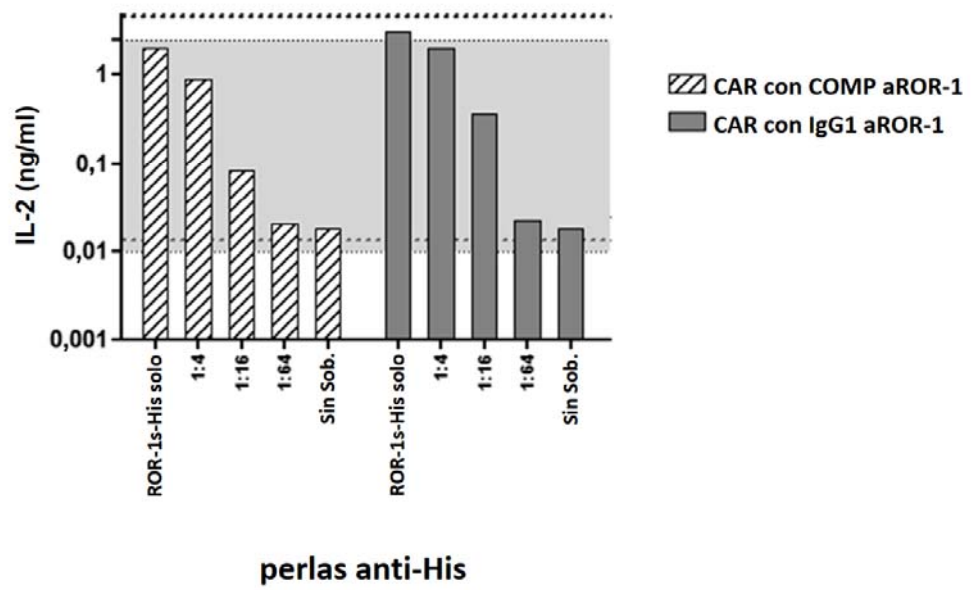


FIGURA 8

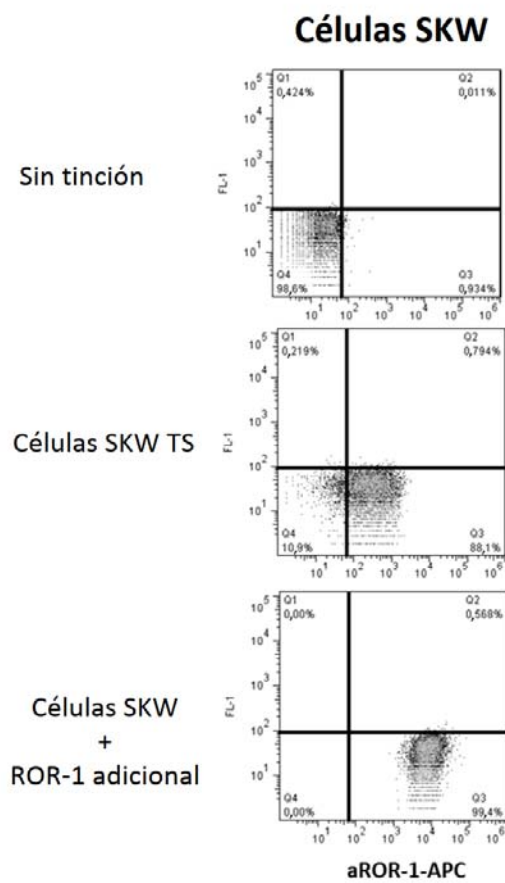


FIGURA 9

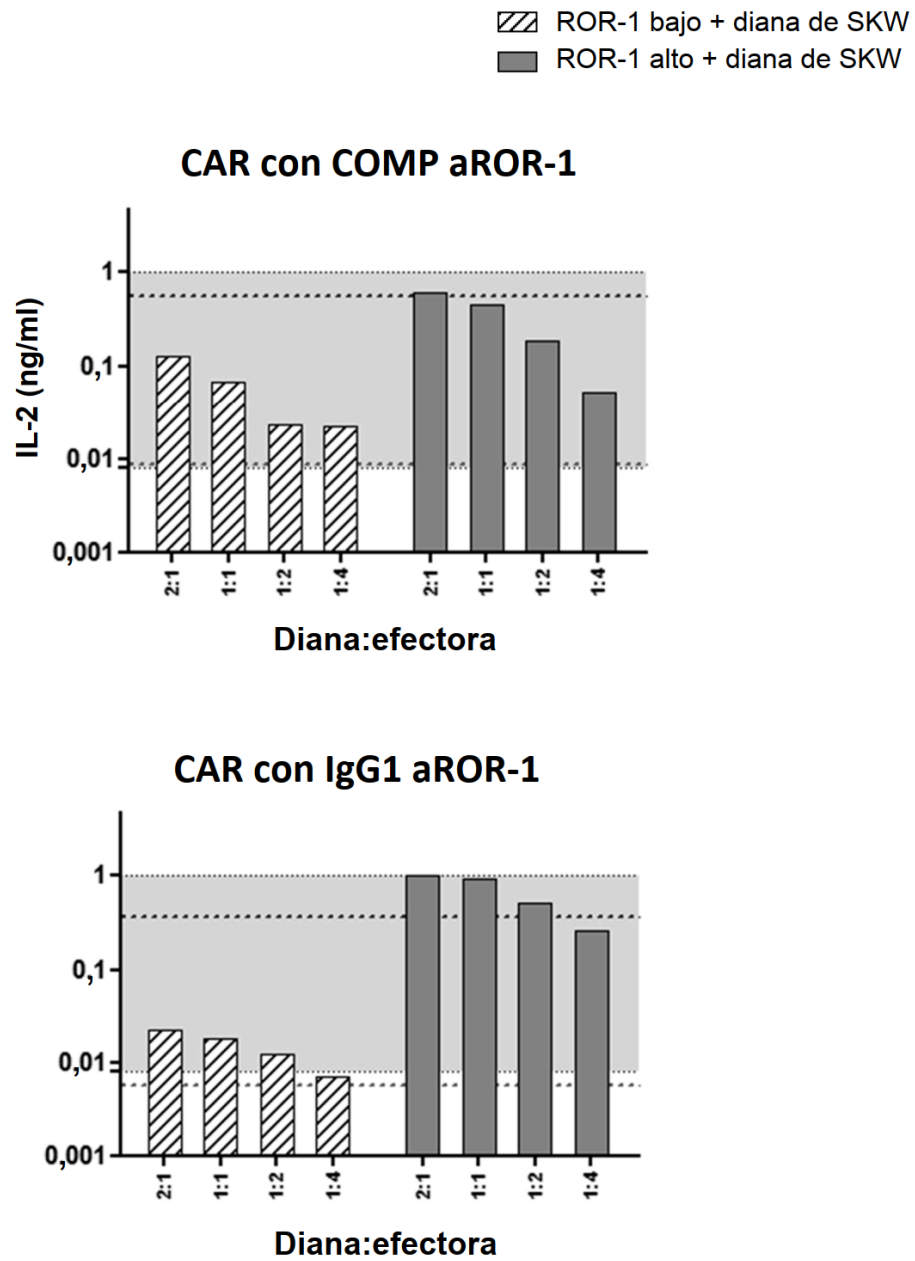


FIGURA 10

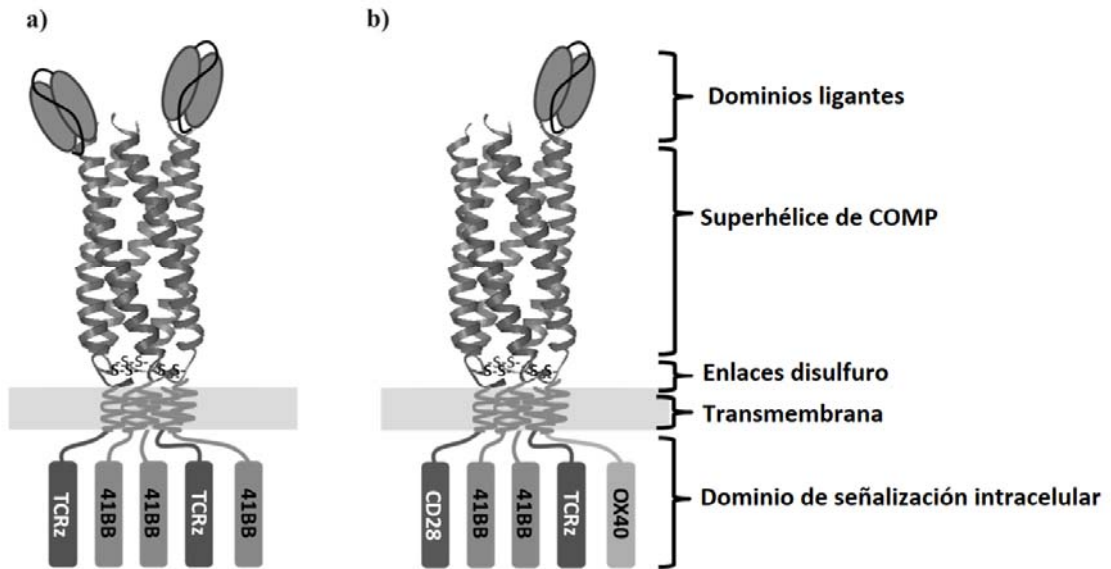


FIGURA 10c

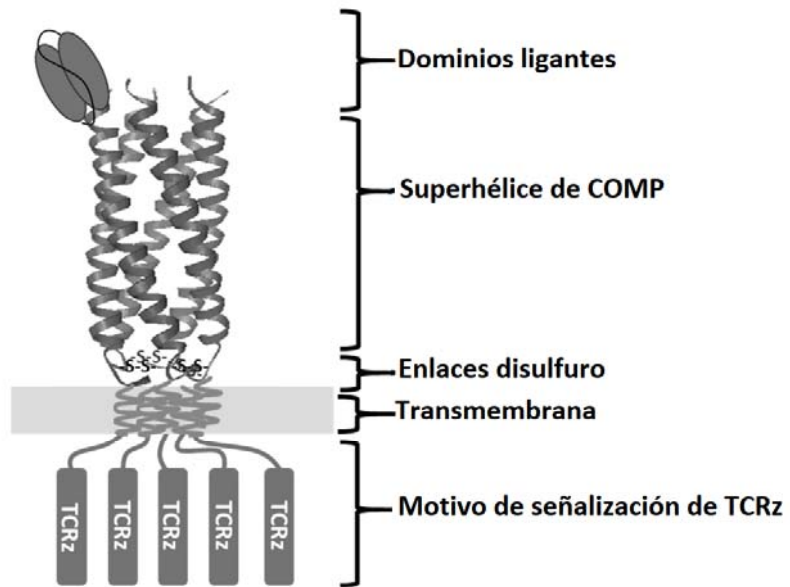


FIGURA 10d

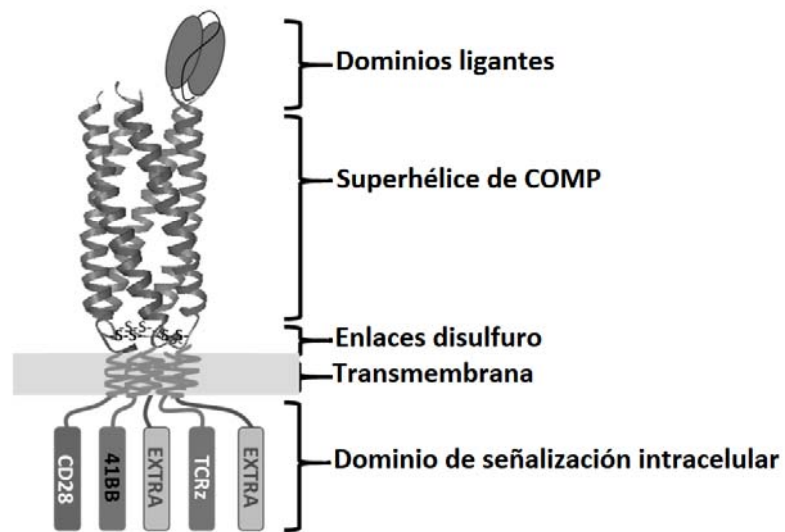


FIGURA 10e

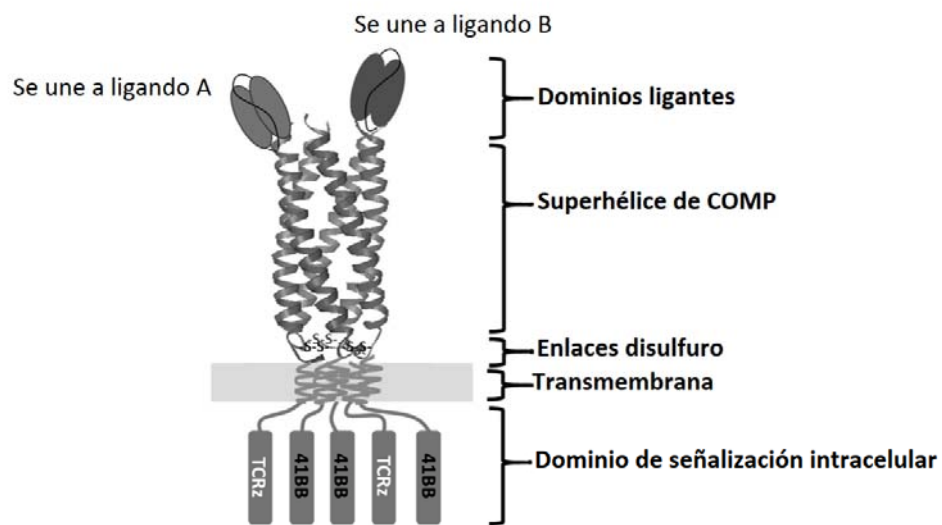


FIGURA 10f

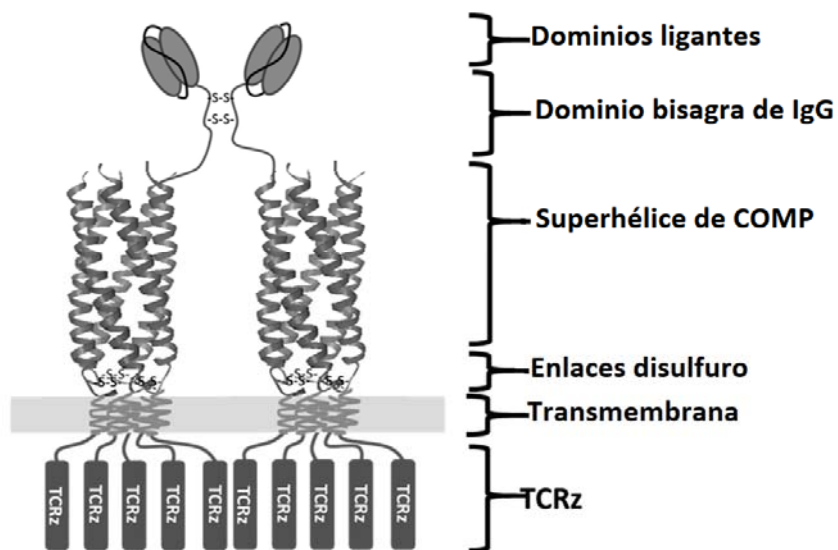


FIGURA 11

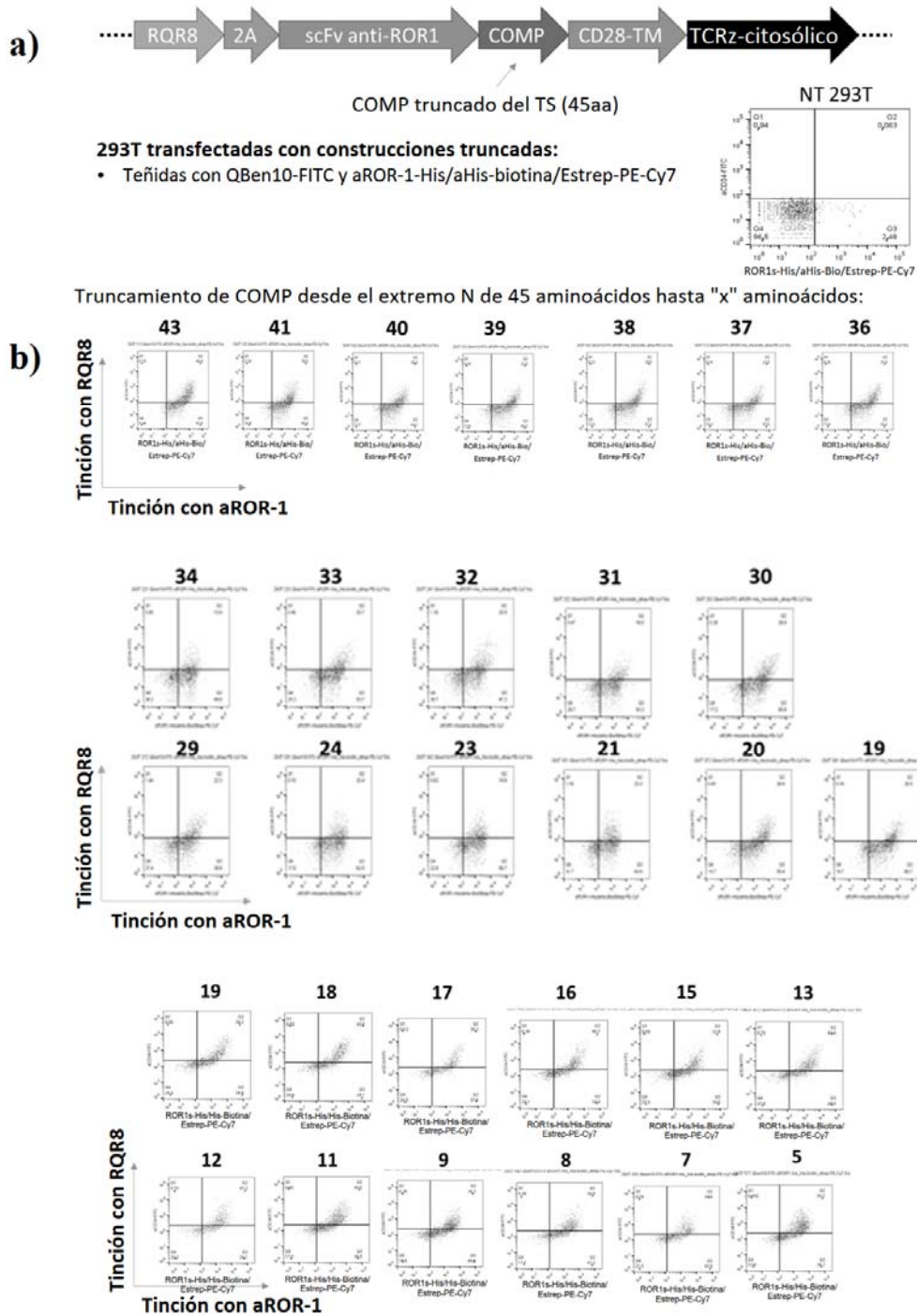


FIGURA 12

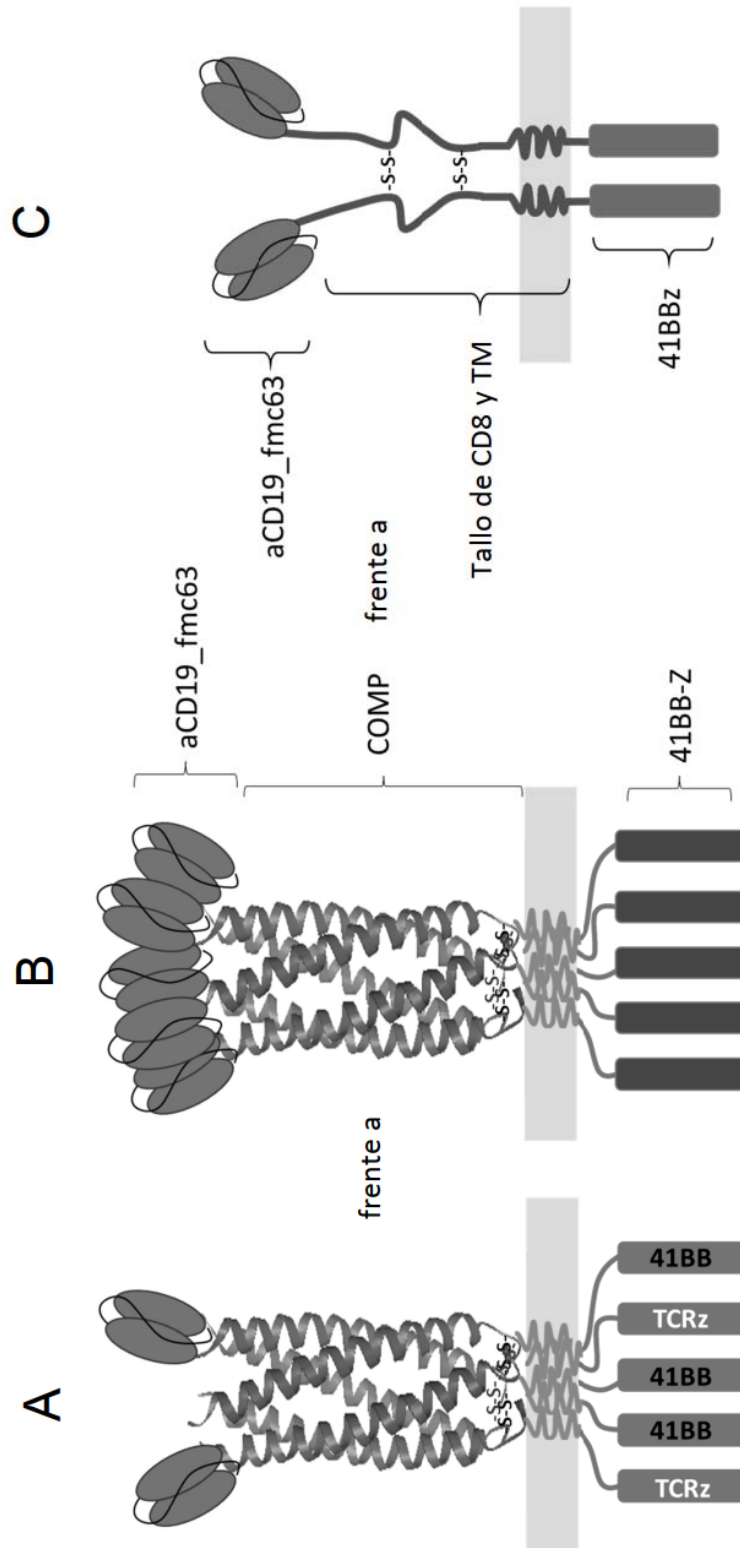


FIGURA 13

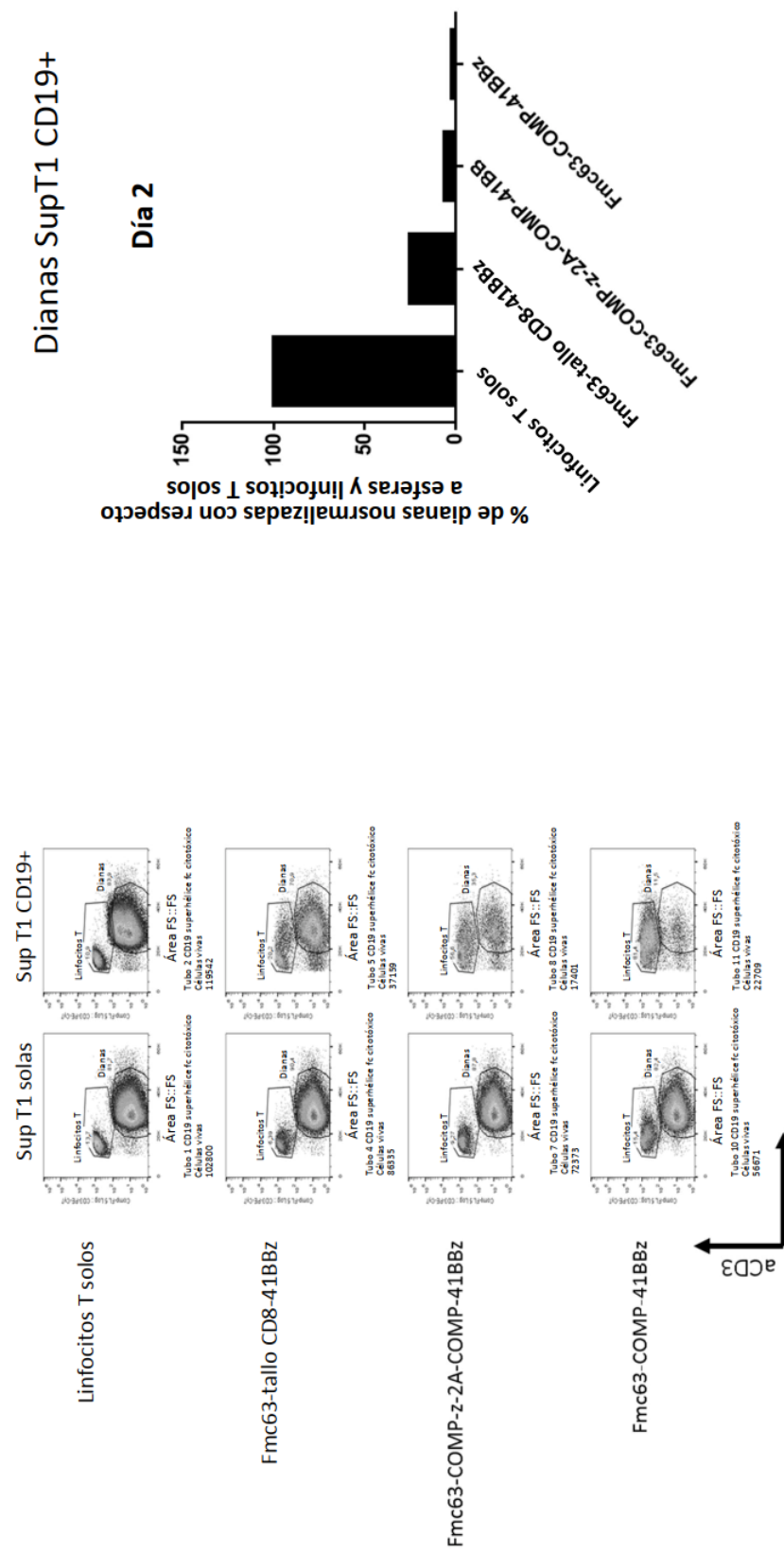
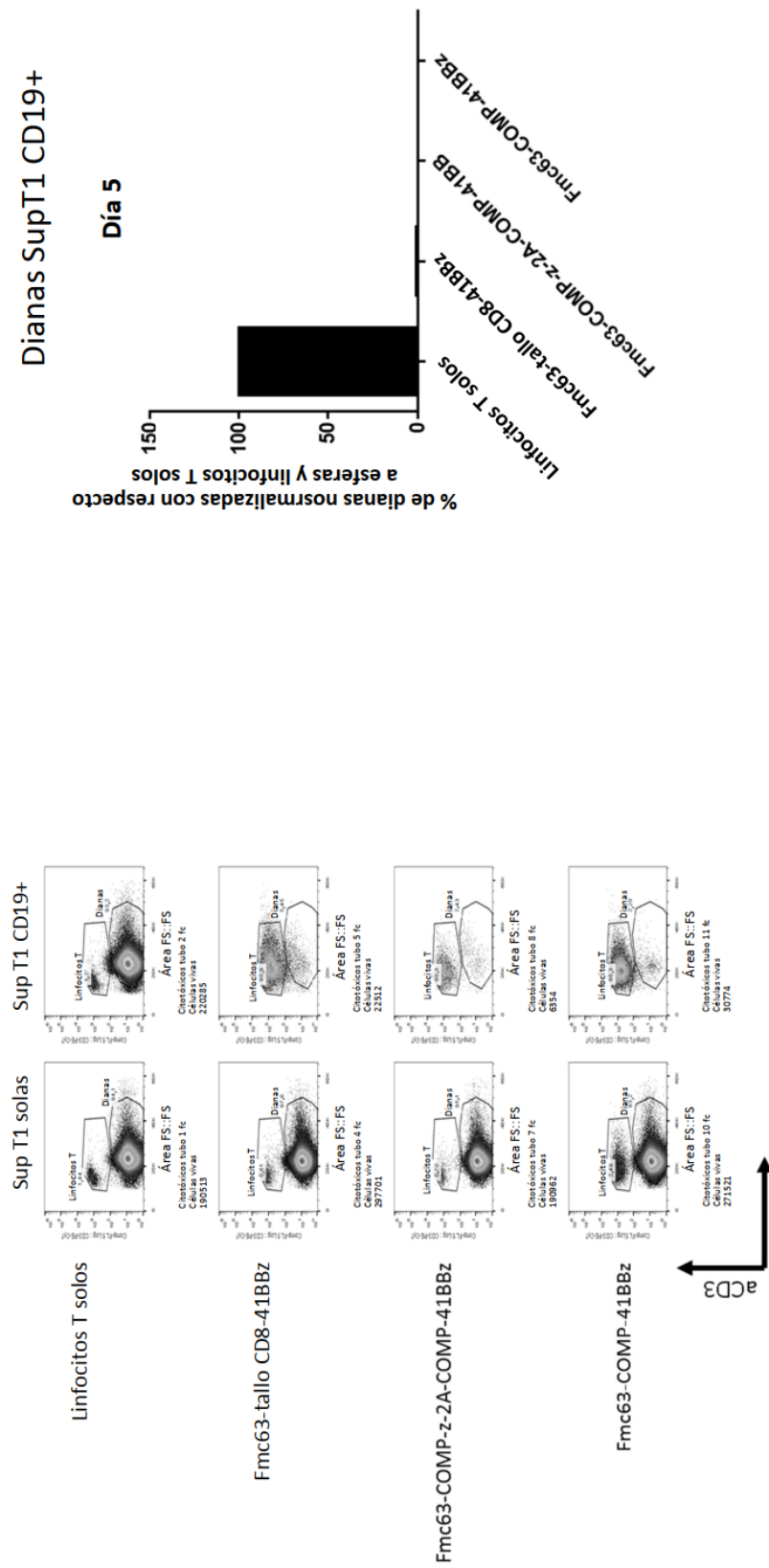


FIGURA 14



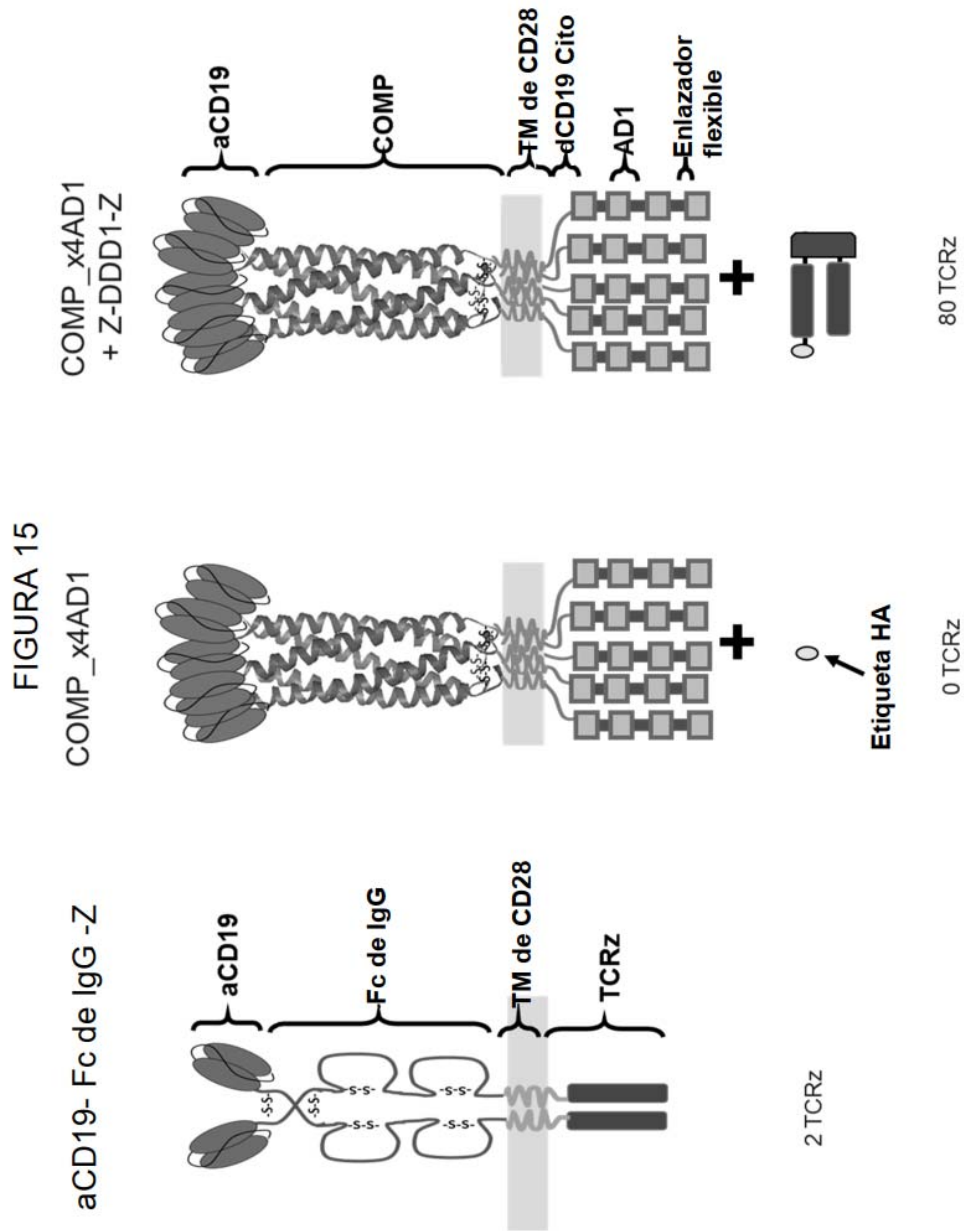


FIGURA 16

