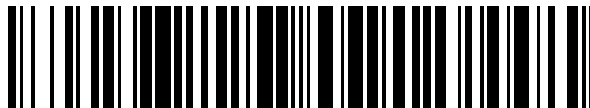


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 801**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2016 PCT/GB2016/051162**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16174406**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2016 E 16721211 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3288970**

54 Título: **Construcción de ácido nucleico para la expresión de más de un receptor de antígeno quimérico**

30 Prioridad:
27.04.2015 GB 201507115

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.08.2020

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 2 777 801 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

Construcción de ácido nucleico para la expresión de más de un receptor de antígeno quimérico

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a construcciones y enfoques para la expresión de más de un receptor de antígeno quimérico (CAR) en la superficie de una célula. La célula puede ser capaz de reconocer específicamente una célula diana, debido a un patrón diferencial de expresión (o sin expresión) de dos o más antígenos por la célula diana. Las construcciones de la invención permiten la modulación de la expresión relativa de los dos o más CAR en la superficie de una célula por un método que implica la coexpresión de los CAR a partir de un único vector.

Antecedentes de la invención

15 Se han descrito una serie de agentes inmunoterapéuticos para su uso en el tratamiento del cáncer, incluyendo los anticuerpos monoclonales terapéuticos (mAbs), mAbs inmunoconjugados, mAbs radioconjugados y moléculas de unión a linfocitos T biespecíficas.

Normalmente, estos agentes inmunoterapéuticos se dirigen a un único antígeno: por ejemplo, rituximab se dirige a CD20; Mylotarg se dirige a CD33; y alemtuzumab se dirige a CD52.

Sin embargo, es relativamente rara la presencia (o ausencia) de un único antígeno para describir eficazmente un cáncer, lo que puede conducir a una falta de especificidad.

25 La mayoría de los cánceres no se pueden diferenciar de los tejidos normales basándose en un solo antígeno. Por lo tanto, se produce una toxicidad considerable "en la diana-fuera del tumor" por la cual los tejidos normales son dañados por la terapia. Por ejemplo, cuando el tratamiento va dirigido a CD20 para tratar los linfomas de linfocitos B con rituximab, se agota todo el compartimento de linfocitos B normales, mientras que cuando va dirigido a CD52 para tratar la leucemia linfocítica crónica, se agota todo el compartimento linfoide, y cuando va dirigido a CD33 para tratar la leucemia mieloide aguda, se daña todo el compartimento mieloide etc.

El problema predicho de la toxicidad "en la diana-fuera del tumor" ha sido confirmado por ensayos clínicos. Por ejemplo, un enfoque dirigido a ERBB2 causó la muerte a un paciente con cáncer de colon metastásico en los pulmones y el hígado. ERBB2 se sobreexpresa en el cáncer del colon en algunos pacientes, pero también se expresa en varios tejidos normales, incluidos el corazón y la vasculatura normal.

40 Para algunos cánceres, dirigir el tratamiento a la presencia de dos antígenos de cáncer puede ser más selectivo y, por lo tanto, más efectivo que dirigirse a uno. Por ejemplo, la leucemia linfocítica B crónica (B-CLL) es una leucemia común que actualmente se trata con un tratamiento dirigido a CD19. Esto trata el linfoma, pero también agota todo el compartimento de linfocitos B, de modo que el tratamiento tiene un efecto tóxico considerable. La B-CLL tiene un fenotipo inusual debido al hecho de que se expresan conjuntamente CD5 y CD19. Al dirigirse solo a las células que expresan CD5 y CD19, sería posible reducir considerablemente la toxicidad en la diana-fuera del tumor.

45 Por lo tanto, existe la necesidad de agentes inmunoterapéuticos que sean capaces de un mayor direccionamiento para reflejar el patrón complejo de expresión de marcador que está asociado con muchos tipos de cánceres.

Receptores de antígeno quiméricos (CAR)

50 Los receptores de antígeno quiméricos son proteínas que injertan la especificidad de un anticuerpo monoclonal (mAb) con 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 terminal que reconoce el antígeno, un espaciador, un dominio transmembrana, todo ello conectado a un endodominio compuesto que transmite señales de supervivencia y activación de linfocitos T (véase la Figura 1A).

55 La forma más habitual de estas moléculas son fusiones de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) derivados 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 dicho CAR, reconocen y eliminan células diana que expresan el antígeno diana. Se han desarrollado varios CAR contra antígenos asociados al tumor, y las estrategias de transferencia adoptiva usando dichos linfocitos T que expresan CAR están actualmente en ensayo clínico para el tratamiento de diversos cánceres.

65 Sin embargo, el uso de linfocitos T que expresan CAR también está asociado con la toxicidad en la diana, fuera del tumor. Por ejemplo, un enfoque basado en CAR dirigido a la carboxi anhidrasa IX (CAIX) para tratar el carcinoma de células renales dio como resultado una toxicidad hepática que se cree que es causada por el ataque específico a las células epiteliales de los conductos biliares (Lamers et al (2013) Mol. Ther. 21:904-912).

Enfoques CAR de doble direccionamiento

5 Con el fin de abordar el problema de la citotoxicidad "en la diana, fuera del tumor", se han desarrollado CAR de linfocitos T con especificidad antigénica doble. En el enfoque de "doble direccionamiento", dos CAR complementarios se expresan conjuntamente en la misma población de linfocitos T, estando cada uno de ellos dirigido a una diana tumoral distante y diseñados para proporcionar señales complementarias.

10 Wlikie et al (2012 J Clin Immunol 32:1059-1070) describe un enfoque de direccionamiento doble en el cual se expresan conjuntamente CAR específicos de ErbB2 y MUC1. El CAR específico de ErbB2 proporcionó la señal CD3ζ solo y el CAR específico de MUC1 proporcionó solo la señal de coestimulación CD28. Se descubrió que la señalización complementaria ocurría en presencia de ambos antígenos, dando lugar a la producción de IL-2. Sin embargo, la producción de IL-2 era modesta en comparación con los linfocitos T diseñados para CAR de control en los cuales la señalización es proporcionada por un endodominio CD28+CD3ζ.

15 Un enfoque similar fue descrito por Kloss et al (2013 Nature Biotechnol. 31:71-75) en el cual se usó un CAR específico de CD-19 que proporciona una señal de activación mediada por CD3ζ junto con un receptor coestimulador quimérico específico de PSMA. Con este diseño 'co-CAR', el CAR del linfocito T recibe una señal de activación cuando encuentra una célula diana con un antígeno, y una señal coestimuladora cuando encuentra una célula diana con el otro antígeno, y solo recibe ambas señales activadoras y coestimuladoras al encontrar células diana que portan ambos antígenos.

20 Esto representa un intento temprano de restringir la actividad de CAR a solo una célula diana con dos antígenos. Este enfoque sin embargo es limitado: aunque la actividad de los linfocitos T con CAR será mayor contra las dianas que expresen ambos antígenos, los linfocitos T con CAR aún destruirán las dianas que expresan solo el antígeno reconocido por el CAR activador; además, la coestimulación produce efectos prolongados en los linfocitos T que persisten mucho después de la liberación de la célula diana. Por lo tanto, podría ser posible una actividad contra los linfocitos T positivos para un antígeno único igual a la de los positivos dobles, por ejemplo, en una situación en la que los tejidos positivos únicos son adyacentes a, o están en una ruta migratoria desde un tumor doble positivo.

25 Por lo tanto, existe la necesidad de enfoques terapéuticos a base de CAR mejorados con una toxicidad reducida en la diana-fuera del tumor, donde la activación de los linfocitos T está totalmente restringida a las células diana que expresan ambos antígenos.

35 Descripción de las figuras

Figura 1: (a) Arquitectura generalizada de un CAR: Un dominio de unión reconoce el antígeno; el espaciador eleva el dominio de unión desde la superficie celular; el dominio transmembranario ancla la proteína a la membrana y el endodominio transmite señales. (b) a (d): Diferentes 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 una (c) o dos (d) señales coestimuladoras adicionales en cis.

Figura 2: Diagrama esquemático que ilustra las puertas lógicas
 La invención se refiere al diseño de linfocitos T para responder a reglas lógicas de la expresión de antígenos de la célula diana. Esto se ilustra mejor con un diagrama de dispersión de FACS. Las poblaciones de células diana expresan ambos, uno o ninguno de los antígenos "A" y "B". Diferentes poblaciones diana (marcadas en rojo) son destruidas por los linfocitos T transducidos con un par de CAR conectados por diferentes puertas. Con los receptores con puerta O, se eliminarán tanto las células simple positivo como las doble positivo. Con los receptores Y, solo se eliminan las células diana doblemente positivas. Con la puerta Y NO, se conservan las dianas doble positivas, mientras que las dianas simple positivas se eliminarán.

Figura 3: Creación de poblaciones de células diana
 Se usaron células Supt1 como células diana. Estas células se transdujeron para expresar CD19, CD33 o tanto CD19 como CD33. Las células diana se tiñeron con anticuerpos apropiados y se analizaron por citometría de flujo.

Figura 4: Representación que muestra ambas versiones del casete utilizado para expresar ambas puertas Y. Los CAR de activación e inhibición se coexpresaron una vez más utilizando una secuencia FMD-2A. Señal1 es un péptido señal derivado de IgG1 (pero puede ser cualquier péptido señal efectivo). scFv1 es el segmento variable de cadena sencilla que reconoce CD19 (pero puede ser un scFv o un bucle peptídico o ligando o, de hecho, cualquier dominio que reconozca cualquier diana arbitraria deseada). STK es el pedúnculo de D8 pero puede ser cualquier dominio extracelular no voluminoso. CD28tm es el dominio transmembrana de CD28 pero puede ser cualquier dominio transmembrana de proteína tipo I estable y CD3Z es el endodominio Zeta de CD3 pero puede ser cualquier endodominio que contenga ITAM. Señal2 es un péptido señal derivado de CD8 pero puede ser cualquier péptido señal efectivo que sea diferente en la secuencia de ADN de la señal 1. scFv reconoce CD33 pero en cuanto a scFv1 es arbitrario. HC2CH3 es la bisagra-CH2-CH3 de la IgG1 humana, pero puede ser cualquier dominio extracelular voluminoso. CD45 y CD148 son los dominios transmembrana y endodominio de CD45 y CD148 respectivamente, pero pueden derivarse de cualquiera de esta clase de proteínas.

Figura 5: Representación esquemática de la estructura proteica de los receptores de antígeno quiméricos (CAR) para las puertas Y. El CAR estimulante que consiste en un dominio scFv anti-CD19 N-terminal seguido por la región extracelular del pedúnculo de CD8 humana, dominio transmembrana CD28 humano y dominio intracelular CD3 Zeta humano (CD247). Se probaron dos CAR inhibidores. Estos consisten en un dominio scFv anti-CD33 N-terminal seguido de la bisagra extracelular, la región CH2 y CH3 (que contienen una mutación pva para reducir la unión de FcR) de la IgG1 humana seguida por el dominio transmembrana e intracelular de CD148 o CD45 humanas. "S" representa la presencia de enlaces disulfuro.

Figura 6: Co-expresión de la activación y CAR inhibidores

Se usaron células BW5147 como células efectoras y se transdujeron para expresar la activación de CAR anti-CD19 y uno de los CAR anti-CD33 inhibidor. Las células efectoras se tiñeron con CD19-Fc de ratón y CD33-Fc de conejo y con los anticuerpos secundarios apropiados y se analizaron por citometría de flujo.

Figura 7: Análisis funcional de las puertas Y

Células efectoras (5×10^4 células) que expresan CAR anti-CD19 de activación y el CAR anti-CD33 inhibidor con el dominio intracelular A) CD148 o B) CXD45 se incubaron conjuntamente con diversas células diana e IL-2 se analizó después de 16 horas por ELISA. El gráfico muestra la secreción máxima de IL-2 de una estimulación química (PMA y Ionomicina) de las células efectoras solo y la IL-2 de fondo de las células efectoras sin ningún estímulo de tres réplicas.

Figura 8: Análisis de la función de la puerta Y

A. El prototipo de la puerta Y se ilustra a la derecha y su función en respuesta a las dianas CD19, CD33 simple positivo y CD19, CD33 doble positivo se muestra a la izquierda. B. Los scFvs se intercambian de modo que el endodominio de activación es activado por CD33 y el endodominio inhibidor es activado por CD19. La puerta Y sigue siendo funcional a pesar de este intercambio de scFv. C. El pedúnculo de CD8 de ratón sustituye a Fc en el espaciador del CAR inhibidor. Con esta modificación, la puerta no responde a las dianas CD19 simple positivo ni a CD19, CD33 doble positivo.

Figura 9: Expresión de los antígenos diana en células diana artificiales

A. Muestra los diagramas de dispersión de citometría de flujo de CD19 frente a CD33 del conjunto original de células diana artificiales derivadas de células SupT1. De izquierda a derecha: células SupT1 doble negativo, células SupT1 positivo para CD19, positivo para CD33 y positivo para CD19 y CD33. B. Muestra los diagramas de dispersión de citometría de flujo de CD19 frente a GD2 de las células diana artificiales generadas para ensayar la puerta CD19 Y GD2: De izquierda a derecha: células SupT1 negativas, células SupT1 que expresan CD19, células SupT1 transducidas con vectores GD2 y GM3-sintasa que se convierten en positivas para GD2 y células SupT1 transducidas con CD19, así como GD2 y GM3 sintasa que son positivas para GD2 y CD19. C. Muestra los diagramas de dispersión de citometría de flujo de CD19 frente a EGFRvIII de las dianas artificiales generadas para ensayar la puerta CD19 Y EGFRvIII. De izquierda a derecha: células SupT1 negativas, células SupT1 que expresan CD19, células SupT1 transducidas con EGFRvIII y células SupT1 transducidas con CD19 y EGFRvIII. D. Muestra los diagramas de dispersión de citometría de flujo de CD19 frente a CD5 de las dianas artificiales generadas para ensayar la puerta CD19 Y CD5. De izquierda a derecha: células 293T negativas, células 293T transducidas con CD19, células 293T transducidas con CD5, células 293T transducidas con vectores CD5 y CD19.

Figura 10: Capacidad de generalización de la puerta Y

A. Representación de la puerta Y modificada de modo que la segunda especificidad de CAR está cambiada respecto a la especificidad original de CD33, para generar 3 nuevos CAR: CD19 Y GD2, CD19 Y EGFRvIII, CD19 Y CD5. B. Puerta CD19 Y GD2 Y: Izquierda: se muestra la expresión de la puerta Y, tinción de CD19-Fc recombinante (eje x) para el CAR de CD19, frente a la tinción de anti-Fc humano (eje Y) para el CAR de GD2. Derecha: función en respuesta a las dianas simple positivo y doble positivo. C. puerta Y CD19 Y EGFRvIII: Izquierda: se muestra la expresión de la puerta Y, tinción de CD19-Fc recombinante (eje x) para el CAR de CD19, frente a la tinción de anti-Fc humano (eje Y) para el CAR de EGFRvIII. Derecha: función en respuesta a las dianas simple positivo y doble positivo. D. Puerta Y CD19 Y CD5: Izquierda: se muestra la expresión de la puerta Y, tinción de CD19-Fc recombinante (eje x) para el CAR de CD19, frente a la tinción de anti-Fc humano (eje Y) para el CAR de CD5. Derecha: función en respuesta a las dianas simple positivo y doble positivo.

Figura 11: Modelo de segregación cinética de puertas lógicas de CAR

Modelo de segregación cinética y comportamiento de la puerta Y, puerta NO Y y controles. Los CAR reconocen CD19 o CD33. La sinapsis inmunológica se puede imaginar entre la línea azul, que representa la membrana de la célula diana y la línea roja, que representa la membrana del linfocito T. '45' es la proteína CD45 nativa presente en los linfocitos T. 'H8' es un ectodominio de CAR con el pedúnculo de CD8 humana como el espaciador. 'Fc' es un ectodominio de CAR con HCH2CH3 humana como el espaciador. 'M8' es un ectodominio de CAR con el pedúnculo de CD8 murina como el espaciador. '19' representa CD19 en la superficie de la célula diana. '33' representa CD33 en la superficie de la célula diana. El símbolo '⊕' representa un endodominio que contiene ITAMS. El símbolo 'θ' representa una fosfatasa con cinética lenta - un endodominio en 'presencia de ligadura' tal como uno que comprende el dominio catalítico de PTPN6 o un ITIM. El símbolo '∅' representa una fosfatasa con cinética rápida

- un endodominio en 'ausencia de ligadura' tal como el endodominio de CD45 o CD148. Este símbolo está aumentado en la figura para resaltar su potente actividad.

- 5 (a) Muestra el comportamiento postulado de la puerta Y funcional que comprende un par de CAR donde el primer CAR reconoce CD19, tiene un espaciador en el pedúnculo de CD8 y un endodominio de activación; y el segundo CAR reconoce CD33, tiene un espaciador Fc y un endodominio CD148;
- (b) Muestra el comportamiento postulado de la puerta Y de control. En este caso, el primer CAR reconoce CD19, tiene un espaciador en el pedúnculo de CD8 y un endodominio de activación; y el segundo CAR reconoce CD33, pero tiene un espaciador en el pedúnculo de CD8 y un endodominio de CD148;
- 10 (c) Muestra el comportamiento postulado de una puerta Y NO funcional que comprende un par de CAR donde el primer CAR reconoce CD19, tiene un espaciador en el pedúnculo de CD8 y un endodominio de activación; y el segundo CAR reconoce CD33, tiene un espaciador en el pedúnculo de CD8 de ratón y un endodominio de PTPN6;
- 15 (d) Muestra el comportamiento postulado de la puerta Y NO de control que comprende un par de CAR donde el primer CAR reconoce CD19, tiene un espaciador en el pedúnculo de CD8 y un endodominio de activación; y el segundo CAR reconoce CD33, pero tiene un espaciador Fc y un endodominio de PTPN6;

20 En la primera columna, las células diana son negativas para CD19 y CD33. En la segunda columna, las células diana son CD19 negativa y CD33 positiva. En la tercera columna, las células diana son CD19 positiva y CD33 negativa. En la cuarta columna, las células diana son positivas para CD19 y CD33.

Figura 12: funcionalidad de la puerta Y en células primarias

25 Se aislaron PBMC de la sangre y se estimularon usando PHA e IL-2. Dos días más tarde las células se transdujeron en placas recubiertas con retronectina con retrovirus que contienen la construcción con la puerta Y CD19:CD33 con la señal de retención Tyrp1 colocada distal o proximal al endodominio (véase la leyenda para la Figura 17). El día 5, el nivel de expresión de los dos CAR traducidos por la construcción de la puerta Y se evaluó mediante citometría de flujo y se agotaron los linfocitos CD56+ (predominantemente los linfocitos NK). El día 6 las PBMC se colocaron en un co-cultivo con células diana en una relación efector:célula diana de 1:2. El día 8 el sobrenadante se recogió y se analizó mediante ELISA para determinar la secreción de IFN-gamma. Los resultados son los

30 resultados agregados de cuatro donantes diferentes.

Figura 13: Se muestra una selección/jerarquía de posibles dominios de espaciador de tamaño creciente. El ectodominio de CD3-Zeta se sugiere como es espaciador más corto posible, seguido de (b) la bisagra de IgG1. (c) pedúnculo de CD8 humana o murina y los ectodominios de CD28 se consideran intermedios en tamaño y co-segregan. (d) La bisagra, el dominio CH2 y CH3 de IgG1 es mayor y más voluminoso y (e) la bisagra, el dominio CH2, CH3 y CH4 de IgM sigue siendo mayor. Dadas las propiedades de las moléculas diana, y el epitopo de los dominios de unión en dichas moléculas diana, es posible usar esta jerarquía de espaciadores para crear un sistema de señalización CAR que co-segrega o segrega aparte de la formación de la sinapsis.

35

Figura 14: Matriz para la plataforma de la puerta Y.

40 Se produjeron múltiples puertas Y y se ensayaron con diversas combinaciones de los espaciadores: bisagra; huCD8STK; huCD28ecto; hulG (HCH2CH3pvaa); y hulGM (CH2HCH3CH4) como se describe en la leyenda para la Figura 13. Se analizaron en la plataforma de la puerta Y como previamente se ha descrito con un CAR de señalización de CD19 y un CAR inhibidor de CD33 con un endodominio inhibidor en ausencia de ligadura de CD148. Azul = predicho; Rojo = probado; NO ESTIM = sin estimulación con ninguna diana afín; Y = funciona como

45 puerta Y.

Figura 15: Métodos utilizados para expresar diferentes proteínas del mismo vector (a) Dos diferentes promotores dentro del mismo casete dan como resultado dos diferentes transcritos diferentes que dan cada uno de ellos lugar a proteínas diferentes. (b) Uso de una secuencia del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) que conduce a un transcrito único que se traduce en dos proteínas independientes. (c) Uso de los resultados del péptido FMDV 2A que da como resultado un único transcrito, y una única poliproteína que se escinde rápidamente en dos proteínas diferentes.

50

Figura 16: El endodominio de TYRP1 es capaz de dirigir la retención de una proteína transmembrana con un endodominio complejo Tyrp1 es una proteína transmembrana tipo I, de 537aa de longitud. El motivo di-leucina, que retiene la proteína en el compartimento intracelular, está indicado como un rectángulo negro en el dominio citoplasmático. (A) Tyrp1 (wt). Tyrp1 tipo silvestre consiste en un péptido de señal, un dominio luminal, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. El dominio citoplasmático contiene la señal de retención di-leucina. (B) Tyrp1 (wt)-SG LinkereGFP. Esta construcción contiene el Tyrp1 de tipo silvestre fusionado simplemente a eGFP a través de un enlazador- serina-glicina-glicina-glicina-serina. El Tyrp1-L-eGFP representa el Tyrp1 citoplasmático-proximal. (C) Tyrp1 Luminal (LM)-Transmembrana (TM)-Enlazador SG-eGFP-Tyrp1 Citoplasmático (CP). Esta construcción constituye el Tyrp1 distal citoplasmático, ya que el enlazador SG-eGFP se interpone entre los dominios transmembrana y citoplasmático. D: Tyrp1 Luminal (LM)-Transmembrana (TM)-Enlazador SG-eGFP. Esta construcción sirve como el control positivo, ya que se ha excluido el dominio citoplasmático que contiene la señal de retención. Todas las construcciones se co-expresan con IRES.CD34. La tinción de las células SupT1

55

60

65

transducidas se muestra con tinción intracelular y superficial izquierda/derecha inferior respectivamente.

Figura 17: Funcionalidad de la señal de retención de TYRP1 en células primarias

Se generó una construcción que co-expresa un CAR anti-CD19 y un anti-CD33 usando un péptido de tipo FMD-2A. También se generaron dos variantes de esta construcción: en la primera variante, el motivo di-leucina de TYRP1 se insertó en el endodominio de CAR anti-CD19 justo proximal al dominio TM; En la segunda variante el mismo motivo di-leucina de TYRP1 se unió al extremo carboxilo del endodominio de CAR anti-CD19. Se aislaron PBMC de la sangre y se estimularon usando PHA e IL-2. Dos días más tarde las células fueron transducidas en placas recubiertas con retronectina con retrovirus que contienen las construcciones de CAR CD19:CD33 diferentes. El día 5 el nivel de expresión de los dos CAR traducidos por la construcción se evaluó mediante citometría de flujo usando las fusiones CD19-Fc y CD33-Fc recombinantes. A. Representación del gen sintético construido para permitir la co-expresión; B. Representación del posterior par de proteínas generado por las tres construcciones; C. Muestra la expresión de los dos receptores por citometría de flujo. En la construcción original, ambos CAR se expresan igualmente. Con la incorporación del motivo di-leucina distalmente en el endodominio del CAR anti-CD19, la expresión del CAR de CD33 sigue constante pero la expresión de CD19 baja hasta niveles intermedios. Con la incorporación del motivo di-leucina proximalmente en el endodominio del CAR anti-CD19, la expresión del CAR de CD33 sigue constante, pero la expresión de CD19 baja hasta niveles bajos.

Figura 18: Señal de retención de la cola citosólica de E3/19K

Se generó una construcción que co-expresa un CAR anti-CD19 y un anti-CD33 usando un péptido de tipo FMD-2A. También se generaron dos variantes de esta construcción: en la primera variante, los últimos 6aa de E3/19K (DEKKMP), que se vio que eran decisivos para su capacidad de retención en el aparato de Golgi/ER, se unieron al extremo carboxilo del endodominio del CAR anti-CD33; en la segunda variante, la cola citosólica completa de la proteína E3/19K del adenovirus se unió al extremo carboxilo del endodominio del CAR anti-CD33

Figura 19: Funcionalidad de la señal de retención de E3/19K

Las construcciones mostradas en la Figura 4 se transfirieron a células 293T y se evaluó el nivel de expresión de los dos CAR traducidos por la construcción mediante citometría de flujo usando las fusiones CD19-Fc y CD33-Fc recombinantes. Se observó una clara retención cuando la proteína E3/19K del adenovirus de longitud completa, o el motivo DEKKMP se colocaba en el receptor anti-CD33. Los niveles de expresión del receptor anti-CD19 no se vieron afectados.

Figura 20: Diagrama esquemático que ilustra la función de las secuencias señal en el direccionamiento de proteínas

Figura 21: Diagrama esquemático de la construcción de ácido nucleico que codifica dos CAR

Figura 22: Verificación de la función de una secuencia de señal sustituida.

PCT/GB2014/053452 describe el sistema de vector que codifica dos receptores de antígeno quiméricos (CAR), uno contra CD19 y uno contra CD33. El péptido de señal utilizado para los CAR en ese estudio fue el péptido de señal de la secuencia de señal de CD8a humana. Para los fines del estudio, esta se sustituyó con el péptido de señal de la región V-III de la cadena kappa de la Ig murina, que tiene la secuencia: METDTLILWVLLLLVPGSTG (los restos hidrófobos están destacados en negrita). Con el fin de establecer que la secuencia de señal de la región V-III de la cadena kappa de la Ig murina funcionaba también como la secuencia de señal de la CD8a humana, se llevó a cabo un estudio comparativo. Para ambas secuencias de señal, se observó la expresión funcional del CAR anti-CD33 y del CAR anti-CD19.

Figura 23: Ensayo del efecto de una delección de un aminoácido en la región V-III de la cadena kappa de la Ig murina. Se creó una cadena kappa mutante 1 con la siguiente delección (mostrada en gris) en la región h METDTLILWVLLLLVPGSTG y se observó la expresión relativa en el CAR anti-CD33 y en el CAR anti-CD19.

Figura 24: Ensayo del efecto de dos delecciones de aminoácidos en la región V-III de la cadena kappa de la Ig murina. Se creó una cadena kappa mutante 2 con las siguientes delecciones (mostradas en gris) en la región h METDTLILWVLLLLVPGSTG y se observó la expresión relativa en el CAR anti-CD33 y en el CAR anti-CD19.

Figura 25: Ensayo del efecto de tres delecciones de aminoácidos en la región V-III de la cadena kappa de la Ig murina. Se creó una cadena kappa mutante 2 con las siguientes delecciones (mostradas en gris) en la región h METDTLILWVLLLLVPGSTG y se observó la expresión relativa en el CAR anti-CD33 y en el CAR anti-CD19.

Figura 26: Ensayo del efecto de cinco delecciones de aminoácidos en la región V-III de la cadena kappa de la Ig murina. Se creó una cadena kappa mutante 2 con las siguientes delecciones (mostradas en gris) en la región h METDTLILWVLLLLVPGSTG y se observó la expresión relativa en el CAR anti-CD33 y en el CAR anti-CD19.

Sumario de aspectos de la invención

Los presentes inventores han desarrollado un panel de pares de receptor de antígeno quimérico "de puertas lógicas"

que, cuando se expresa en una célula, tal como un linfocito T, son capaces de detectar un patrón particular de expresión de al menos dos antígenos diana. Si los al menos dos antígenos diana se designan arbitrariamente como antígeno A y antígeno B, las tres posibles opciones son las siguientes:

- 5 "PUERTA O" - activa el linfocito T cuando el antígeno A o el antígeno B está presente en la célula diana
 "PUERTA Y" - activa el linfocito T solo cuando están presentes tanto el antígeno A como el antígeno B en la célula diana
 "PUERTA Y NO" - activa el linfocito T si solo el antígeno A es el que está presente en la célula diana, pero no si están presentes ambos, antígeno A y B, en la célula diana

10 Los linfocitos T diseñados que expresan estas combinaciones de CAR pueden diseñarse para ser exquisitamente específicos de células cancerosas, basándose en su expresión particular (o falta de expresión) de dos o más marcadores.

15 Los presentes inventores también han descubierto que, cuando un CAR se co-expresa con un segundo CAR como una poliproteína que después de la traducción es subsiguientemente escindida para separar los dos CAR, es posible modular la expresión en la superficie celular de los dos CAR reduciendo el tráfico hasta la superficie celular de uno o ambos CAR y/o reduciendo su semivida en la superficie de la célula. Esta necesidad no se limita a un par de CAR, pero puede usarse para permitir el control de la expresión relativa de múltiples proteínas traducidas inicialmente.

20 Como se emplea en esta memoria, 'poliproteína' se refiere a una secuencia polipeptídica traducida de una construcción de ácido nucleico como una entidad individual, pero que comprende secuencias polipeptídicas que se separan posteriormente y que funcionan como entidades discretas (por ejemplo, CAR separados).

25 La presente invención se refiere a una puerta lógica Y, en la cual la expresión relativa de los dos CAR está modulada.

Así pues, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende la siguiente estructura:

30 A-X-B

en la cual

35 X es una secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio de escisión; y
 A y B son secuencias de ácido nucleico que codifican un primer y un segundo receptor de antígeno quimérico (CAR), comprendiendo cada CAR:

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

45 en el que los dominios de unión a antígeno del primer y segundo CAR se unen a diferentes antígenos, en el que el espaciador del primer CAR tiene un tamaño diferente al del espaciador del segundo CAR de modo que cuando el primer CAR y el segundo CAR se unen a sus respectivos antígenos diana en la superficie celular, el primer y segundo CAR se encuentran especialmente separados en la membrana celular; en el que uno del primero o segundo CAR es un CAR activador que comprende un endodominio activador y el otro CAR es un CAR inhibidor que comprende un endodominio inhibidor en ausencia de ligadura, CAR inhibidor que inhibe la activación de linfocitos T por el CAR activador en ausencia de ligadura por el CAR inhibidor, pero no inhibe significativamente la activación de linfocitos T por el CAR activador cuando el CAR inhibidor está ligado; y en el que:

- 50 (a) el primero y/o segundo CAR comprende una señal de retención intracelular; y/o
 (b) el péptido de señal del primer o segundo CAR comprende una o más mutaciones de manera que tiene menos aminoácidos hidrófobos.

55 Para (b) el péptido de señal mutado puede tener menos aminoácidos hidrófobos que la secuencia del péptido señal "de tipo silvestre" de la que deriva. El péptido de señal mutado puede tener menos aminoácidos hidrófobos que el péptido de señal del otro CAR.

60 El espaciador del primer CAR puede tener una longitud y/o carga y/o forma y/o configuración y/o glicosilación diferentes al espaciador del segundo CAR, de modo que cuando el primer CAR y el segundo CAR se unen a sus respectivos antígenos diana, el primer CAR y el segundo CAR se encuentran espacialmente separados en el linfocito T. La ligadura del primer y segundo CAR a sus respectivos antígenos hace que se compartimentalicen juntos o separados en la sinapsis inmunológica, lo que da como resultado el control de la activación. Esto puede entenderse cuando se considera el modelo de separación cinética de la activación de linfocitos T (ver más abajo).

ES 2 777 801 T3

El primer espaciador o el segundo espaciador puede comprender un pedúnculo de CD8 y el otro espaciador puede comprender la bisagra, el dominio CH2 y CH3 de una IgG1.

5 En la presente invención, que se refiere a la puerta "Y", uno del primer o segundo CAR es un CAR activador que comprende un endodominio activador, y el otro CAR es un CAR inhibidor en "ausencia de ligadura" que comprende un endodominio inhibidor. El CAR inhibidor en ausencia de ligadura inhibe la activación de los linfocitos T por el CAR activador en ausencia de ligadura por el CAR inhibidor, pero no inhibe significativamente la activación de linfocitos T por el CAR activador cuando el CAR inhibidor está ligado. Dado que el espaciador del primer CAR tiene una longitud y/o carga y/o forma y/o configuración y/o glicosilación diferentes al espaciador del segundo CAR, cuando ambos CAR están ligados, se segregan. Esto hace que el CAR inhibidor se separe espacialmente del CAR activador, de modo que puede ocurrir la activación de los linfocitos T. Por lo tanto, la activación de linfocitos T solo ocurre en respuesta a una célula diana que porta ambos antígenos afines.

15 El endodominio inhibidor puede comprender todo o parte del endodominio de una tirosina fosfatasa de tipo receptor, tal como CD148 o CD45.

20 El dominio de unión a antígeno del primer CAR se puede unir a CD5 y el dominio de unión a antígeno del segundo CAR se puede unir a CD19. Este se puede usar para dirigirse a la leucemia linfocítica crónica (CLL). Esta enfermedad se puede tratar dirigiéndose solo a CD19, pero a costa de agotar todo el compartimento de linfocitos B. Las células de CLL son inusuales en el sentido de que co-expresan CD5 y CD19. El direccionamiento a este par de antígenos con una puerta Y aumentará la especificidad y reducirá la toxicidad.

25 En la presente memoria se describe un método para modular la expresión relativa de dos (o más) CAR en una puerta lógica Y, mediante uno o ambos de los siguientes enfoques (a) mediante la incorporación de una señal de retención intracelular en uno o ambos (CAR) y (b) alterando el péptido de señal de un CAR con el fin de eliminar o sustituir aminoácidos hidrófobos.

30 En particular, el nivel de expresión relativa del CAR activador, en relación al CAR inhibidor, se puede reducir mediante uno de los enfoques anteriormente mencionados.

Para el enfoque (a), el endodominio del CAR puede comprender la señal de retención intracelular.

35 La señal de retención intracelular puede apartar al CAR de la vía secretora y/o dirigirlo a un compartimento intracelular unido a la membrana,

tal como un compartimento lisosomal, endosomal o del aparato de Golgi.

40 La señal de retención intracelular puede, por ejemplo, ser una señal de clasificación basada en tirosina, una señal de clasificación basada en dileucina, una señal de grupo ácido, una señal de evitación lisosomal, una señal tipo NPFX(1,2)D, una señal KDEL, KXX'X' o KX'KX'X' (en la que X' es cualquier aminoácido).

45 La señal de retención intracelular puede comprender una secuencia seleccionada del grupo de: NPX'Y, YX'X'Z', [DE]X'X'X'L[LI], DX'X'LL, DP[FW], FX'DX'F, NPF, LZ'X'Z'[DE], LLDLL, PWDLW, KDEL, KXX'X' o KX'KX'X'; en la que X' es cualquier aminoácido y Z' es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba voluminosa.

La señal de retención intracelular puede comprender cualquiera de las secuencias mostradas en las Tablas 1 a 5.

50 La señal de retención intracelular puede comprender la señal de retención intracelular proteína relacionada con tirosinasa (TYRP)-1.

La señal de retención intracelular puede comprender el dominio intracelular TYRP-1. La señal de retención intracelular puede comprender la secuencia NQPLLED (SEQ ID NO: 1).

55 La señal de retención intracelular puede comprender la señal de retención intracelular E3/19K adenoviral. La señal de retención intracelular puede comprender el dominio citosólico E3/19K. La señal de retención intracelular puede comprender la secuencia KYKSRRSFIDEKKMP (SEQ ID NO: 2); o DEKKMP (SEQ ID NO: 3).

La señal de retención intracelular puede ser proximal o distal a un dominio transmembrana del CAR.

60 Para el enfoque (b), los péptidos de señal del primer y segundo CAR son diferentes. Pueden diferir en el número de aminoácidos hidrófobos. Un péptido de señal puede comprender una o más mutaciones de tal manera que tiene menos aminoácidos hidrófobos a) que la secuencia de tipo silvestre de la cual se derivó; o b) que el otro péptido de señal.

65 En particular, el péptido de señal del CAR activador puede alterarse para eliminar o sustituir aminoácidos hidrófobos, de tal manera que la expresión relativa del CAR activador, respecto al CAR inhibidor, está reducida en la superficie celular.

- 5 Los péptidos de señal pueden ser diferentes y la secuencia de un péptido de señal puede alterarse de tal modo que se eliminen o sustituyan los aminoácidos hidrófobos. Como alternativa, el primer péptido de señal y el segundo péptido de señal pueden derivar de la misma secuencia, pero un péptido de señal puede comprender una o más deleciones/sustituciones de aminoácidos para eliminar/sustituir uno o más aminoácidos hidrófobos en comparación con el otro péptido de señal.
- 10 El o los aminoácidos hidrófobos eliminados o sustituidos pueden seleccionarse del grupo: Alanina (A); Valina (V); Isoleucina (I); Leucina (L); Metionina (M); Fenilalanina (P); Tirosina (Y); Triptófano (W) o el grupo Valina (V); Isoleucina (I); Leucina (L); y triptófano (W).
- 15 Para el enfoque (b) un péptido de señal puede comprender una, dos, tres, cuatro o cinco mutaciones, de modo que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco menos aminoácidos hidrófobos que: la secuencia de señal de la cual se deriva y/o el otro péptido de señal.
- 20 En la construcción de ácido nucleico de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico de X puede ser una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido autoescindible, un sitio de escisión de furina o un sitio de escisión del virus del grabado del tabaco.
- 25 La secuencia de ácido nucleico de X puede ser un ácido nucleico que codifica un péptido autoescindible de 2A de un aftovirus o cardiovirus o un péptido similar a 2A.
- 30 La construcción de ácido nucleico puede comprender un tercer ácido nucleico que codifica una proteína de interés (POI). La POI puede ser una proteína transmembrana.
- 35 La POI se puede seleccionar de una lista de: receptores excitadores tales como 41BB, OX40, CD27, CD28 y moléculas relacionadas; o receptores inhibidores tales como PD1, CTLA4, LAIR1, CD22 y moléculas relacionadas; o moléculas de receptor de citocina tales como IL1R, IL2R, IL7R, IL15R y moléculas relacionadas; o moléculas de referencia tales como N-CAM, V-CAM, L1-CAM, LFA-1, CDH1-3, selectinas o integrinas. La POI puede ser un tercer CAR.
- 40 La POI puede ser una proteína sintética tal como un gen suicida o un gen marcador.
- 45 La cantidad de CAR que comprende una señal de retención intracelular y/o que tiene un péptido de señal alterado que se expresa en la superficie de la célula puede ser, por ejemplo, menos de 90 %, 70 %, 50 % o 30 % en comparación con un CAR expresado de la misma construcción de ácido nucleico que no comprende una señal de retención intracelular y que tiene un péptido de señal inalterado.
- 50 La construcción de ácido nucleico también puede codificar otro polipéptido, por ejemplo un polipéptido que permita la selección de células transducidas y/o que permita que las células expresen el polipéptido a eliminar.
- 55 Se pueden usar codones alternativos en regiones de secuencia que codifican secuencias de aminoácidos iguales o similares, para evitar la recombinación homóloga.
- 60 En un segundo aspecto la presente invención proporciona un vector que comprende una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la invención.
- 65 El vector puede ser un vector retroviral o un vector lentiviral o un transposón.
- 70 En un tercer aspecto la presente invención proporciona una célula que comprende una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la invención o un vector de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.
- 75 La célula puede ser una célula inmunitaria tal como un linfocito T o un linfocito citolítico natural (NK).
- 80 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para fabricar una célula de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, que comprende la etapa de introducir: una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la invención o un vector de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, en una célula ex-vivo.
- 85 La célula puede ser parte o derivar de una muestra aislada de un sujeto.
- 90 La célula usada en el método del cuarto aspecto de la invención puede ser una muestra aislada de un paciente, un donante de trasplante hematopoyético relacionado o no relacionado, un donante completamente desconectado, de sangre del cordón umbilical, diferenciado de una línea celular embrionaria, diferenciado de una línea celular progenitora inducible, o derivado de una línea celular transformada.
- 95 En un quinto aspecto la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de células de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención. La composición puede ser una composición de linfocitos

T y/o NK autólogos.

La presente divulgación se refiere a un método para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, que comprende la etapa de administrar una composición farmacéutica de acuerdo con el quinto aspecto de la invención a un sujeto.

El método puede comprender las siguientes etapas:

- (i) aislamiento de una muestra que contiene linfocitos T y/o NK de un sujeto;
- (ii) transducción o transfección de linfocitos T y/o NK con: una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la invención o un vector de acuerdo con el segundo aspecto de la invención; y
- (iii) administración de los linfocitos T y/o NK de (ii) a un sujeto.

También se proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con el quinto aspecto de la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

En la presente memoria se describe el uso de una célula de acuerdo con el tercer aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

También se describe en la presente memoria un método para modular la expresión relativa en la superficie celular de un CAR activador expresado a partir de una única construcción de ácido nucleico con un CAR inhibidor en ausencia de ligadura que comprende (a) incluir una señal de retención intracelular en la secuencia de ácido nucleico que codifica el CAR(s) activador y/o (b) alterar la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de señal del CAR activador para eliminar o reemplazar uno o más aminoácidos hidrófobos en comparación con el péptido de señal del CAR inhibidor en ausencia de ligadura. La construcción de ácido nucleico puede ser como se define en el primer aspecto de la invención.

La puerta Y basada en la segregación cinética de la presente invención ofrece una ventaja técnica significativa para el "co-CAR" descrito anteriormente, es decir, el enfoque de direccionamiento doble en el que dos antígenos son reconocidos por dos CAR que suministran una señal de activación o coestimulación al linfocito T.

Con el enfoque co-CAR, aunque podría esperarse una mayor actividad contra las células diana que portan ambos antígenos, puede esperarse una actividad considerable contra los tejidos que portan solo el antígeno reconocido por el CAR activador. Se puede esperar que esta actividad sea al menos la de un CAR de primera generación. Los CAR de primera generación han producido una toxicidad considerable: por ejemplo, se observó toxicidad biliar en las pruebas clínicas de un CAR de primera generación que reconoce la anhidrasa carbónica IX que se expresó inesperadamente en el epitelio biliar (ref. Rotterdam). Especialmente, los efectores diferenciados terminalmente no requieren ni responden a señales coestimuladoras, por lo que cualquier linfocito T con CAR diferenciado terminalmente actuaría al máximo a pesar de la ausencia de una señal CAR coestimuladora.

Adicionalmente, las señales coestimuladoras conducen a efectos duraderos en la población de linfocitos T. Estos efectos duran mucho más que la interacción en la sinapsis linfocito/diana. Por consiguiente, los linfocitos T CAR que se activan completamente dentro del tumor y migran podrían tener una actividad de la máxima potencia contra tejidos normales que portan un único antígeno. Este efecto de "rebose" puede ser más pronunciado en los tejidos dentro, cerca o que drenan del tumor. De hecho, se han propuesto y probado estrategias basadas en el concepto de la actividad de un CAR de primera generación que es potenciado por señales coestimuladoras no relacionadas con la activación de CAR, sino a través de un receptor distinto, (Rossig, Blood. 2002 Mar 15;99(6):2009-16.).

Por lo tanto, se puede esperar que el enfoque de co-CAR resulte, en el mejor de los casos, en una reducción, pero no en la abolición de la toxicidad hacia un tejido normal que expresa un único antígeno. La presente invención usa la segregación cinética en la sinapsis inmunológica formada entre el linfocito T/célula diana para regular la activación de los linfocitos T. En consecuencia, se logra un estricto control absoluto de la activación en ausencia del segundo antígeno. Por lo tanto, la totalidad de la activación de los linfocitos T está restringida a las células diana que expresan ambos antígenos, la puerta Y debería funcionar independientemente del tipo de célula efectora o del estado de diferenciación, no siendo posible la activación de los linfocitos T por la puerta Y debido al efecto de "rebose".

Además, la capacidad de modular la expresión relativa de los dos CAR, proporcionada por la presente invención, aporta ventajas adicionales a la puerta Y. Cuando un sistema de puerta Y funciona correctamente, el CAR inhibidor en ausencia de ligadura inhibe la activación de los linfocitos T por el CAR activador en ausencia de ligadura por el CAR inhibidor, pero no inhibe significativamente la activación de linfocitos T por el CAR activador cuando el CAR inhibidor está ligado. Sin embargo, en algunos sistemas, el CAR activador es "hiperactivo", lo que conduce a un alto nivel de fondo, es decir, la activación por el CAR activador en ausencia de ligadura por el CAR inhibidor. Los presentes inventores han descubierto que, regulando negativamente la expresión relativa del CAR activador en comparación con el CAR inhibidor, es posible "ajustar" el sistema y reducir el nivel de activación de fondo en ausencia del segundo antígeno.

La inclusión de una señal de retención intracelular en un CAR, o la alteración del péptido de señal del CAR para reducir

la cantidad de aminoácidos hidrófobos, reduce la cantidad de CAR expresada en la superficie celular. Como tal, se puede modular el nivel de expresión relativo de dos CAR expresados a partir de una sola construcción. Como un CAR solo está activo en la superficie celular, la reducción de la expresión relativa en la superficie celular del CAR también reduce su actividad relativa.

5 Por lo tanto, la presente invención proporciona una construcción de ácido nucleico que codifica una puerta Y, en la que el nivel relativo de expresión de los dos o más CAR puede ajustarse finamente, ya sea para reducir la expresión del CAR activador (como se describió anteriormente) o para reflejar el nivel relativo de expresión de los antígenos respectivos en la célula diana.

10 Esta invención puede ampliarse para modular la expresión relativa de tres o más proteínas expresadas como un polipéptido concatenado, separadas por sitios de escisión y expresión relativa en la superficie dictada por señales de retención o péptidos de señal de actividad diferente.

15 Descripción detallada

RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICOS (CAR)

20 La presente invención proporciona una construcción de ácido nucleico que expresa dos o más receptores de antígeno quiméricos (CAR).

25 Los CAR, que se muestran esquemáticamente en la Figura 1, son proteínas de transmembrana quiméricas de tipo I que conectan un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular (ligante) con un dominio de señalización intracelular (endodominio). El ligante es típicamente un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal (mAb), pero puede basarse en otros formatos que comprenden un sitio de unión a antígeno similar a un anticuerpo. Normalmente, es necesario un dominio espaciador para aislar el ligante de la membrana y permitir una orientación adecuada. Un dominio espaciador común utilizado es el Fc de IgG1. Los espaciadores más compactos pueden ser suficientes, por ejemplo, el pedúnculo de CD8α e incluso solo la bisagra de IgG1 sola, dependiendo del antígeno. Un dominio transmembrana ancla la proteína en la membrana celular y conecta el espaciador al endodominio.

35 Los primeros diseños de CAR tenían endodominios derivados de las partes intracelulares de la cadena y de FcεR1 o CD3ζ. Por consiguiente, estos receptores de primera generación transmitieron la señal inmunológica 1, que fue suficiente para desencadenar la eliminación de los linfocitos T de las células diana relacionadas, pero no pudo 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 CD3ζ da como resultado receptores de segunda generación que pueden transmitir una señal activadora y coestimuladora simultáneamente después del reconocimiento de antígeno. El dominio coestimulador más utilizado es el de CD28. Esto suministra la señal coestimuladora más potente, es decir, la señal inmunológica 2, que desencadena la proliferación de linfocitos T. También 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.

45 Los ácidos nucleicos que codifican CAR pueden transferirse a linfocitos T usando, por ejemplo, vectores retrovirales. Se pueden emplear vectores lentivirales. De esta manera, puede generarse una gran cantidad de linfocitos T específicos de cáncer 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 tumorales que expresan el antígeno diana.

50 Los inventores han definido tres categorías distintas de células que coexpresan un primer CAR y un segundo CAR de modo que la célula puede reconocer un patrón de expresión deseado en las células diana como una puerta lógica como se detalla en las tablas de verdad: Tabla 1, 2 y 3.

55 Tanto el primero como el segundo (y opcionalmente el subsiguiente) CAR comprenden:

- (i) un dominio de unión a antígeno;
- (ii) un espaciador;
- (iii) un dominio transmembrana; y
- 60 (iii) un dominio intracelular, que pueden comprender o asociarse con un endodominio de señalización de linfocitos T.

Tabla 1: Tabla de verdad para la PUERTA O de CAR

Antígeno A	Antígeno B	Respuesta
Ausente	Ausente	Sin activación

Ausente	Presente	Activación
Presente	Ausente	Activación
Presente	Presente	Activación

Tabla 2: Tabla de verdad para la PUERTA Y de CAR

<i>Antígeno A</i>	<i>Antígeno B</i>	<i>Respuesta</i>
Ausente	Ausente	Sin activación
Ausente	Presente	Sin activación
Presente	Ausente	Sin activación
Presente	Presente	Activación

Tabla 3: Tabla de verdad para la PUERTA Y NO de CAR

<i>Antígeno A</i>	<i>Antígeno B</i>	<i>Respuesta</i>
Ausente	Ausente	Sin activación
Ausente	Presente	Sin activación
Presente	Ausente	Activación
Presente	Presente	Sin activación

5 Utilizando la construcción de ácido nucleico de la presente invención, el primer y segundo CAR se producen como un polipéptido que comprende ambos CAR, junto con un sitio de escisión.

10 La SEQ ID NO: 4 y 5 son ejemplos de puertas Y, que comprenden dos CAR. La construcción de ácido nucleico de la invención puede comprender una u otra parte de las siguientes secuencias de aminoácidos, que corresponde a un único CAR. Una o ambas secuencias de CAR se puede modificar para incluir una o más señales de retención intracelular, y/o para alterar sus péptidos de señal, como se define a continuación.

15 La SEQ ID NO: 4 es una puerta Y de CAR que reconoce CD19 Y CD33 usando una fosfatasa CD148
La SEQ ID NO:5 es una implementación alternativa de la PUERTA Y de CAR que reconoce CD19 Y CD33 que usa una fosfatasa CD45.

SEQ ID NO: 4
 20 MSLPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD
 GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGK
 LEITKAGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG
 VSWIRQPPRKGLEWLGVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAIYYC
 AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSDPTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGG
 25 AVHTRGLDFACDIFWLVWGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNL
 YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
 RRRGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPRAEGRGSLTTCGDVEENPGPMAVPTQ
 VLGLLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYFNLVWYQQKPKGKAPKLLI
 YDNRNLADGVPSPRFSGSGSGTQYTLTISLQPEDFATYYCQHYKKNYPLTFGQGTKEIKRS
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMH
 30 WIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
 AAQDAYTGGYFDYWGQGLTVTVSSMDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK
 DTLMIARTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHE
 35 ALHNHYTQKSLSLSPGKDPKAVFGCIFGALVIVTVGGFIFWRKKRDKAKNNEVFSQIKPK
 KSKLIRVENFEAYFKKQADSNCGFEEYEDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPY
 DISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHSKDKFIATQGPLPNTLKDFWRMVEKNVYAIIMLT
 KCVEQGRTKCEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSESHPLRQFHF
 TSWPDHGVPTDLDLLINFRYLVRDYMKQSPPEPILVHCSAGVGRGTGTFIAIDRLIYQIENEN
 40 TVDVYGVYDLRMRPLMVQTEDQYVFLNQCVDLIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAP
 VTTFGKTNFYIA

La SEQ ID NO: 4 se desglosa de la siguiente manera:

45 Péptido de señal derivado de CD8a humana:
MSLPVTALLLPLALLLHAARP
scFv aCD19:

50 DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITKAGGGGSGGGGSGGG

ES 2 777 801 T3

GSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIW
GSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDETAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQG
TSVTVS

5 Enlazador:
SD

CD8aSTK humana:
PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

10 CD28TM humana:
FVWLVWGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
Dominio intracelular de CD3zeta humana:

15 RRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

Péptido 2A:
RAEGRGSLTTCGDVEENPGP

20 Péptido de señal derivado de la cadena kappa de la Ig de ratón:
MAVPTQVLGLLLLWLTDA
scFv aCD33:

25 RCDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPS
RFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTKEIKRSGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEW
VSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFD
YWGQGLTVTSSM

30 Enlazador:
DPA
Bisagra y Fc derivados de la IgG1 humana con mutaciones para prevenir la asociación de FcRg
(HCH2CH3pva):

35 EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMIARTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40 Enlazador:
KDPK
CD148TM humana:
AVFGCIFGALVIVTVGGFIFW
Dominio intracelular de CD148 humana:

45 RKKRDKAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFAEEYEDLKLVGISQPKY
AAELAENRGKKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHKKDFIATQGPLPNTL

50 KDFWRMVWEKNVYAIIMLTKCVEQGRTKCEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRD
FTVKNIQTSSEHPLRQFHFTSWPDHGVDPDITDILLINFRYLVRDYMKSPPESPILVHCSAGV
GRTGTFIAIDRLIYQIENENTVDVYGVYDLRMLHRPLMVQTEDQYVFLNQCVLDIVRSQKDSK
VDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNFYA

SEQ ID NO: 5

55 MSLPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQQKPD
GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGK
LEITKAGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV
VSWIRQPPRKGLEWLGVIWGETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDETAIYYC
AKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTSSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
AVHTRGLDFACDIFWLVWGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
60 YNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRAEGRGSLTTCGDVEENPGPMAVPTQ
VLGLLLLWLTDA RCDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLI
YDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTKEIKR
GGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMH
65 WIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNLSRAEDTAVYYC
AAQDAYTGGYFDYWGQGLTVTSSMDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK

DTLMIARTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE
 5 ALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKALIAFLAFLIIVTSIALLWLKYIYDLHKKRSCNLDEQQELVER
 DDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQKNRYV
 DILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDFWRMIWEQKAT
 VIVMVRCEEENRNC AEYWPSMEEGTRAFGDVWVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKKEKAT
 GREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKRRRVNAFSNFFSGPIWHCSAGVGRGTGYIGIDA
 10 MLEGLEAENKVDVYGYWKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSLHPYL
 HNMKKRDPSPSEPSLEAEFQRLPSYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKH
 ELEMSKESEHDSDESSDDSDSEEPSKYINASFIMS YWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMI
 FQRKVKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEKGQTYGDIEVDLKD TDKSSTYTLRVFELRHSKR
 KDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQWKQKLPQKNSSEGNKHHKSTPLLIHCRDG
 15 SQQTGIFCALLNLES AETEEVDIFQWKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIAS TYPAQNG
 QVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEKLP EAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSV
 NGPASPALNQGS

La SEQ ID NO: 5 se desglosa de la siguiente manera:

20 Péptido de señal derivado de CD8a humana:
 MSLPVTALLLPLALLLHAARP
 scFv aCD19:

25 DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
 SGGSGGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITKAGGGGSGGGGSGGG
 GSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLVGIW
 GSETTYNSALKSRLTIKDNSSKQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQG
 TSVTVS

30 Enlazador:
 SD
 CD8aSTK humana:
 PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
 CD28TM humana:
 35 FWVLWVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
 Dominio intracelular de CD3zeta humana:

40 RRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEG
 LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

Péptido 2A:
 RAEGRGSLTTCGDVEENPGP
 Péptido de señal derivado de la cadena kappa de la Ig de ratón:
 MAVPTQVLGLLLLLWLTDA
 45 scFv aCD33:

50 RCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPS
 RFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGGGKLEIKRSGGGGSGGGGSGG
 GGGSGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEW
 VSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFD
 YWGQGLTVTVSSM

55 Enlazador:
 DPA
 Bisagra y Fc derivados de la IgG1 humana con mutaciones para prevenir la asociación de FcRg
 (HCH2CH3pvaa):

60 EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

65 Enlazador:
 KDPK
 CD45TM humana:
 ALIAFLAFLIIVTSIALLVLY

Dominio intracelular de CD45 humana:

KIYDLHKKRSCNLDEQQELVERDDEKQLMNVPIHADILLETYKRKIADEGRLFLAEFQSIPR
 VFSKFPIKEARKPFNQKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYIAA
 5 QGPRDETVDDFWRMIWEQKATVIVMVTTRCEEGRNRKCAEYWPSMEEGTRAFGDVWVKIN
 QHKRCPDYIIQKLNIVNKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLKLRRRVNAFSNFFS
 GPIWHCSAGVGRTGTIYIGDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRQRCLMVQVEAQYILIHQA
 LVEYNQFGETEVNLSLHPYLHNMKKRDPPSEPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQHIGNQEEN
 10 KSKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDSDSEEPSKYINASFIMSYWKP
 EVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKVKVIVMLTELKHGDQEICAQYWEGEKQTYGDIEVDL
 KDTDKSSTYTLRVFELRHSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQVVKQLPQK
 NSSEGNKHHKSTPLLIHCRDGSQQTGIFCALLNLLESAETEEWDIFQVVKALRKARPGMVS
 TFEQYQFLYDVIASYPANQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEKLPEA
 15 KEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALNQS

La presente invención se refiere a la modulación de la expresión relativa de dos o más CAR en una puerta Y. Esto se puede hacer, por ejemplo, incluyendo una señal de retención intracelular en uno u otro CAR.

En relación con la SEQ ID NO: 4 y 5 dadas anteriormente, una posición adecuada para la señal de retención intracelular puede determinarse fácilmente basándose en la posición de la señal de retención, o señales de un tipo similar, en su proteína nativa. El efecto modulador de la señal de retención también puede ajustarse eligiendo una determinada posición para la señal de retención en la molécula.

Por ejemplo, la construcción de ácido nucleico puede comprender una secuencia de proteína de retención de tyrp-1, tal como:

RARRSMDEANQPLLTDQYQCYAEEYEKLNPNQSVV (SEQ ID NO: 6)

Dicha secuencia se puede incluir, por ejemplo, en la secuencia de CAR de CD19 con el fin de reducir la expresión relativa del CAR de CD19 con respecto al CAR de CD33.

La posición de la señal de retención de tyrp-1 en el receptor aCD19 alterará la cantidad de reducción: para niveles de expresión bajos, la señal de retención de tyrp-1 puede colocarse entre la "CD28TM humana" y el "dominio intracelular de CD3zeta humana"; para niveles de expresión medios, la señal de retención de tyrp-1 puede colocarse entre el "dominio intracelular de CD3zeta humana" y el "péptido 2A" en la SEQ ID NO: 4 o 5.

Como alternativa, la construcción de ácido nucleico puede comprender la señal de retención intracelular E3/19K adenoviral. La señal de retención intracelular puede comprender el dominio citosólico de E3/19K KYKSRRSFIDEKKMP (SEQ ID NO: 2) o una parte del mismo, tal como la secuencia DEKKMP (SEQ ID NO: 3).

La señal de retención de E3/19K se puede colocar en el extremo C del CAR cuya expresión se va a reducir.

La construcción de ácido nucleico de la invención puede codificar la SEQ ID NO: 4 o 5, o cualquiera de sus componentes, tal como el CAR de CD19 o el CAR de CD33.

La construcción de ácido nucleico de la invención puede codificar una variante de la parte que codifica el CAR de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 4 o 5 que tiene al menos 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad de secuencia, siempre que la secuencia variante sea un CAR que tiene las propiedades requeridas.

Los métodos de alineación de secuencias son bien conocidos en la técnica y se logran utilizando programas de alineación adecuados. El % de identidad de secuencia se refiere al porcentaje de restos de aminoácidos o nucleótidos que son idénticos en las dos secuencias cuando están alineadas de manera óptima. La homología o identidad de la secuencia de nucleótidos y proteínas puede determinarse utilizando algoritmos estándar como un programa BLAST (Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología), utilizando parámetros predeterminados, que están disponibles públicamente en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Otros algoritmos para determinar la identidad u homología de la secuencia incluyen: LALIGN (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/> y <http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/nucleotide.html>), AMAS (Análisis de múltiples secuencias alineadas, en <http://www.compbio.dundee.ac.uk/Software/Amas/amas.html>), FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>), Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), SIM (<http://web.expasy.org/sim/>), y EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html).

MODELO DE SEGREGACIÓN CINÉTICA

El emparejamiento posterior de CAR para generar la puerta Y y la puerta Y NO se basa en el modelo de segregación cinética (KS) de activación de linfocitos T. Este es un modelo funcional, respaldado por datos experimentales, que explica cómo el reconocimiento de antígeno por un receptor de linfocitos T se convierte en señales de activación aguas

abajo. Brevemente: en el estado fundamental, los componentes de señalización en la membrana de los linfocitos T están en homeostasis dinámica, donde los ITAM desfosforilados se ven favorecidos sobre los ITAM fosforilados. Esto se debe a una mayor actividad de las fosfatasa transmembrana CD45/CD148 respecto a las quinasas fijadas a la membrana, tal como Ick. Cuando un linfocito T se une a una célula diana a través del reconocimiento de un receptor de linfocitos T (o CAR) del antígeno afín, se forman estrechas sinapsis inmunológicas. Esta estrecha yuxtaposición de los linfocitos T y las membranas diana excluye CD45/CD148 debido a sus grandes ectodominios que no pueden caber en la sinapsis. La segregación de una alta concentración de ITAM y quinasas asociadas a receptores de linfocitos T en la sinapsis, en ausencia de fosfatasa, conduce a un estado donde se favorecen los ITAM fosforilados. ZAP70 reconoce un umbral de ITAM fosforilados y propaga una señal de activación de linfocitos T. Este conocimiento avanzado de la activación de linfocitos T es explotado por la presente invención. En particular, la invención se basa en el conocimiento de cómo los ectodominios de diferente longitud y/o volumen y/o carga y/o configuración y/o glicosilación dan como resultado una segregación diferencial tras la formación de sinapsis.

LA PUERTA Y LÓGICA DE CAR

En la puerta Y, un CAR comprende un endodominio activador y un CAR comprende un endodominio inhibidor donde el CAR inhibidor inhibe constitutivamente el primer CAR activador, pero al reconocer su antígeno afín libera su inhibición del CAR activador. De esta manera, un linfocito T puede diseñarse para activarse solo si una célula diana expresa ambos antígenos afines. Este comportamiento se logra mediante el CAR activador que comprende un endodominio activador que contiene dominios ITAM, por ejemplo, el endodominio de CD3 Zeta, y el CAR inhibidor que comprende el endodominio de una fosfatasa capaz de desfosforilar un ITAM (por ejemplo, CD45 o CD148). Esencialmente, los dominios del espaciador de ambos CAR son significativamente diferentes en tamaño. Cuando solo está ligado el CAR activador, el CAR inhibidor está en solución en la superficie del linfocito T y puede difundirse fuera de la sinapsis inhibiendo el CAR activador. Cuando ambos CAR están ligados, debido a diferencias en las propiedades del espaciador, los CAR activadores e inhibidores están segregados diferencialmente, lo que permite que el CAR activador desencadene la activación de los linfocitos T sin ser obstaculizada por el CAR inhibidor.

Esto es de considerable utilidad en el campo de la terapia contra el cáncer. En la actualidad, las inmunoterapias de forma típica se dirigen a un antígeno. La mayoría de los cánceres no se pueden diferenciar de los tejidos normales basándose en un solo antígeno. Por lo tanto, se produce una toxicidad considerable "en la diana-fuera del tumor" por la cual los tejidos normales son dañados por la terapia. Por ejemplo, cuando el tratamiento va dirigido a CD20 para tratar los linfomas de linfocitos B con rituximab, se agota todo el compartimento de linfocitos B normales. Por ejemplo, mientras que cuando va dirigido a CD52 para tratar la leucemia linfocítica crónica, se agota todo el compartimento linfocítico. Por ejemplo, y cuando va dirigido a CD33 para tratar la leucemia mieloide aguda, se daña todo el compartimento mieloide etc. Al restringir la actividad a un par de antígenos, se puede desarrollar un direccionamiento mucho más refinado y, por lo tanto, una terapia menos tóxica. Un ejemplo práctico es el direccionamiento a la CLL que expresa tanto CD5 como CD19. Solo una pequeña proporción de linfocitos B normales expresa ambos antígenos, por lo que la toxicidad fuera de la diana del direccionamiento a ambos antígenos con una puerta Y lógica es sustancialmente menor que el direccionamiento a cada antígeno individualmente.

El diseño de la presente invención es una mejora considerable con respecto a la implementación previa como se describe por Wilkie y col. ((2012). J. Clin. Immunol. 32, 1059-1070) y posteriormente probado *in vivo* (Kloss et al (2013) Nat. Biotechnol. 31, 71-75). En esta implementación, el primer CAR comprende un endodominio activador, y el segundo un dominio coestimulador. De esta forma, un linfocito T solo recibe una señal activadora y coestimuladora cuando ambos antígenos están presentes. Sin embargo, el linfocito T se seguirá activando en la sola presencia del primer antígeno, dando como resultado una posible toxicidad fuera de la diana. Adicionalmente, la implementación de la presente invención permite múltiples puertas unidas compuestas donde una célula puede interpretar un patrón complejo de antígenos.

TABLA 4

<i>Tipo de cáncer</i>	<i>Antígenos</i>
Leucemia linfocítica crónica	CD5, CD19
Neuroblastoma	ALK, GD2
Glioma	EGFR, Vimentina
Mieloma múltiple	BCMA, CD138
Carcinoma de células renales	Anhidrasa carbónica IX, G250
T-ALL	CD2, N-cadherina
Cáncer de próstata	PSMA, hepsina (u otros)

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE ANTÍGENOS DIANA

5 La puerta Y de la presente invención se activa en presencia de al menos dos antígenos, por ejemplo en presencia de uno de los pares de antígenos enumerados en la Tabla 4. Se sabe que para algunos pares de antígenos, los niveles relativos de expresión de los antígenos en la célula cancerosa pueden ser muy diferentes. En estas circunstancias, la presente invención permite modular los niveles relativos de expresión de cada CAR específico de antígeno para reflejar el nivel relativo de expresión del antígeno diana.

10 Por ejemplo, Cabezudo et al (1999 Haematologica 84:413) investigaron la expresión de CD5 y CD19 en células de una variedad de trastornos de los linfocitos B, incluyendo la leucemia linfocítica crónica (CLL), la leucemia prolinfocítica de linfocitos B (PLL), el linfoma esplénico de linfocitos vellosos (SLVL) y el linfoma de células del manto (Mc) en fase leucémica. Se encontró que para todos los trastornos de linfocitos B investigados, los niveles de expresión de CD5 fueron 2-8 veces mayores que el nivel de expresión de CD19.

15 En la puerta Y de la presente invención, la expresión relativa del CAR de CD19 y del CAR de CD5 puede modificarse para reflejar los niveles relativos de CD19 y CD5 en las células cancerosas. Por ejemplo, el nivel de expresión del CAR de CD19 puede reducirse mediante la incorporación de una señal de retención intracelular o alterando el péptido de señal de modo que tenga menos aminoácidos hidrófobos que el péptido de señal del CAR de CD5.

PUERTAS COMPUESTAS

25 El modelo de segregación cinética con los componentes anteriores permite construir puertas compuestas, por ejemplo, un linfocito T que se activa en respuesta a patrones de más de dos antígenos diana. Por ejemplo, es posible fabricar un linfocito T que solo se active cuando estén presentes tres antígenos (A Y B Y C). En este caso, una célula expresa tres CAR, reconociendo cada uno los antígenos A, B y C. Un CAR es excitador y dos son inhibidores, teniendo cada CAR dominios de espaciador que dan como resultado la segregación diferencial. Solo cuando los tres están ligados, se activará el linfocito T. Otro ejemplo: (A O B) Y C: en este caso, los CAR que reconocen los antígenos A y B se activan y tienen espaciadores que están co-localizados, mientras que el CAR que reconoce el antígeno C es inhibidor y tiene un espaciador que da lugar a una co-segregación diferente.

PÉPTIDO SEÑAL

35 Los polipéptidos A y B (y opcionalmente otros, C, D, etc.) codificados por la construcción de ácido nucleico de la invención comprenden cada uno una secuencia señal de modo que cuando el polipéptido se expresa dentro de una célula, la proteína nascente se dirige al retículo endoplásmico (ER) (véase la Figura 20).

40 La expresión "péptido de señal" es sinónima de "secuencia de señal".

Un péptido de señal es un péptido corto, frecuentemente de 5-30 aminoácidos de longitud, presente en el extremo N de la mayoría de las proteínas recién sintetizadas que están destinadas a la vía secretora. Estas proteínas incluyen aquellas que residen dentro de ciertos orgánulos (por ejemplo, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi o los endosomas), se secretan de la célula y las proteínas transmembrana.

45 Los péptidos de señal comúnmente contienen una secuencia central que es un tramo largo de aminoácidos hidrófobos que tiende a formar una única hélice alfa. El péptido señal puede empezar con un tramo corto de aminoácidos cargados positivamente, que ayuda a reforzar la topología adecuada 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 completarse la translocación, para generar un péptido señal libre y una proteína madura. Después, los péptidos señales libres se digieren por proteasas específicas.

50 El péptido señal está normalmente situado en el extremo amino de la molécula, aunque se conocen algunos péptidos de señal en el extremo carboxilo.

55 Como se ha mencionado anteriormente, las secuencias de señal tienen un estructura tripartita, que consiste en una región central hidrófoba (región h) flanqueada por una región n y c. Esta última contiene el sitio de escisión consenso

de peptidasa señal (SPasa). Normalmente, las secuencias de señal se escinden co-traduccionalmente, y las secuencias de señal escindidas resultantes se denominan péptidos de señal.

5 En el péptido de señal de la región V-III de la cadena kappa de la Ig murina, que tiene la secuencia: METDTLILWVLLLLVPGSTG: la región n tiene la secuencia METD; la región h (mostrada en negrita) tiene la secuencia TLILWVLLLLV; y la región c tiene la secuencia PGSTG.

10 En la construcción de ácido nucleico de la presente invención, los péptidos señal de los dos CAR pueden diferir en el número de aminoácidos hidrófobos, para modular los niveles relativos de expresión de los CAR en la superficie celular.

15 En la construcción de ácido nucleico de la presente invención la secuencia de señal de los dos (o más) polipéptidos puede por lo tanto diferir en sus regiones h. Un polipéptido (que tiene una expresión relativa más alta) puede tener un mayor número de aminoácidos hidrófobos en la región h que el otro polipéptido (que tiene una expresión relativa más baja). El péptido de señal del polipéptido con una expresión relativa más baja puede comprender una o más mutaciones de aminoácidos, tales como sustituciones o deleciones, de aminoácidos hidrófobos en la región h que el péptido de señal del polipéptido con una expresión relativa más baja.

20 El primer péptido de señal y el segundo péptido de señal pueden tener sustancialmente las mismas regiones n y c, pero diferir en la región h como se explicó anteriormente. "Sustancialmente igual" indica que las regiones n y c pueden ser idénticas entre el primer y el segundo péptido de señal o pueden diferir en uno, dos o tres aminoácidos en la cadena n o c, sin afectar a la función del péptido de señal.

25 Los aminoácidos hidrófobos en el núcleo pueden, por ejemplo, ser: Alanina (A); Valina (V); Isoleucina (I); Leucina (L); Metionina (M); Fenilalanina (P); Tirosina (Y); o Triptófano (W).

Los aminoácidos hidrófobos mutados para alterar la eficiencia del péptido de señal pueden ser cualquiera de la lista anterior, en particular: Valina (V); Isoleucina (I); Leucina (L); y triptófano (W).

30 De los restos de la región h, un péptido de señal (por ejemplo, el péptido de señal alterado) puede comprender al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % menos aminoácidos hidrófobos que el otro péptido de señal (por ejemplo, el péptido de señal inalterado).

35 Cuando la región h comprende 5-15 aminoácidos, un péptido de señal puede comprender 1, 2, 3, 4 o 5 más aminoácidos hidrófobos que el otro péptido de señal.

El péptido de señal puede comprender 1, 2, 3, 4 o 5 deleciones o sustituciones de aminoácidos hidrófobos. Los aminoácidos hidrófobos pueden estar sustituidos con aminoácidos no hidrófobos, tales como aminoácidos hidrófilos o neutros.

40 Las secuencias de señal se pueden detectar o predecir utilizando técnicas de software (véase por ejemplo, <http://www.predisi.de/>).

45 Se conoce una gran cantidad de secuencias de señal, y están disponibles en bases de datos. Por ejemplo, <http://www.signalpeptide.de> incluye 2109 péptidos de señal de mamíferos confirmados en su base de datos.

La Tabla 5 proporciona una lista de secuencias de señal exclusivamente con fines ilustrativos. El núcleo hidrófobo se resalta en negrita. Esto incluye ejemplos de aminoácidos que pueden sustituirse o eliminarse para los fines de la presente invención.

50 Tabla 5

Número de Registro	Nombre de entrada	Nombre de la proteína	Longitud	Secuencia de señal (núcleo hidrófobo)
P01730	CD4_HUMAN	Glucoproteína CD4 de la superficie de linfocitos T	25	MNRGV PFRLHLLLVQLALLPAATQG
P08575	CD45_HUMAN	Antígeno común de leucocitos	23	MYLWLKLLAF GFALDTEVFVTG
P01732	CD8A_HUMAN	Cadena alfa de la glucoproteína CD8 de la superficie de linfocitos T	21	MALPVTALLLPLALLL HAARP
P10966	CD8B_HUMAN	Cadena beta de la glucoproteína CD8 de la superficie de linfocitos T	21	MRPRLWLLLA AQLTVLHGNSV

(continuación)

Número de Registro	Nombre de entrada	Nombre de la proteína	Longitud	Secuencia de señal (núcleo hidrófobo)
P06729	CD2_HUMAN	Antígeno de superficie celular CD2 de linfocitos T	24	MSFPCKFVASFLLIFNVSSKGAVS
P06127	CD5_HUMAN	Glucoproteína CD5 de la superficie de linfocitos T	24	MPMGSLQLATLYLLGMLVASCLG
P09564	CD7_HUMAN	Antígeno CD7 de linfocitos T	25	MAGPPRLLLLPLLLALARGLPGALA
P17643	TYRP1_HUMAN	ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico oxidasa	24	MSAPKLLSLGCIFFPLLLFQQARA
P00709	LALBA_HUMAN	Alfa-lactalbúmina	19	MRFFVPLFLVGLFPAILA
P16278	BGAL_HUMAN	Beta-galactosidasa	23	MPGFLVRILPLLLVLLLLGPTRG
P31358	CD52_HUMAN	antígeno CAMPATH-1	24	MKRFLFLLLTISLLVMVQIQTGLS
Q6YHK3	CD109_HUMAN	antígeno CD109	21	MQGPPLLTAHLLCVCTAALA
P01024	CO3_HUMAN	Complemento C3	22	MGPTSGPSLLLLLTHLPLALG
P10144	GRAB_HUMAN	Granzima B	18	MQPILLLLAFLLPRADA
P04434	KV310_HUMAN	Región V-III de la cadena kappa de la Ig VH	20	MEAPAQLLFLLLLWLPDTRR
P06312	KV401_HUMAN	Región V-IV de la cadena kappa de la Ig	20	MVLQTVFISLLWISGAYG
P06319	LV605_HUMAN	Región V-VI de la cadena lambda de la Ig EB4	19	MAWAPLLLTLAHCTDCWA
P31785	IL2RG_HUMAN	Cadena gamma común del receptor de citocina	22	MLKPSLPFTSLLFLQLPLLVG
Q8N4F0	BPIL1_HUMAN	Proteína bactericida/aumentadora de la permeabilidad tipo 1	20	MAWASRLGLLLALLPVGA
P55899	FCGRN_HUMAN	Subunidad grande p51 del receptor de IgG FcRn	23	MGVPRQPWALGLLLFLPGSLG

El péptido de señal mutado comprende una o más mutaciones de tal manera que tiene menos aminoácidos hidrófobos que el péptido de señal de tipo silvestre del que se deriva. La expresión "tipo silvestre" significa la secuencia del péptido de señal que se produce en la proteína natural de la que deriva. Por ejemplo, el péptido de señal descrito en los ejemplos es el péptido de señal de la región V-III de la cadena kappa de la Ig murina, que tiene la secuencia de tipo: METDTLILWVLLLLVPGSTG.

La expresión "tipo silvestre" también incluye péptidos de señal derivados de una proteína natural que comprende una o más mutaciones de aminoácidos en la región n o c. Por ejemplo, es frecuente modificar un péptido de señal natural con una sustitución de aminoácidos conservada en el extremo N para introducir un sitio de restricción. Dichas secuencias de péptidos señal modificadas (que no comprenden ninguna mutación en la región h) se consideran "de tipo silvestre" para los fines de la presente invención.

La presente divulgación se refiere también a secuencias de péptidos de señal sintéticos, que no se pueden definir con respecto a una secuencia de tipo silvestre. En este caso, el péptido de señal de un polipéptido comprende menos aminoácidos hidrófobos que la secuencia señal del otro polipéptido. Las dos secuencias de señal pueden derivarse de la misma secuencia de péptido de señal sintético, pero difieren en el número de aminoácidos hidrófobos en la región central.

DOMINIO DE UNIÓN A ANTÍGENO

El dominio de unión al antígeno es la porción del CAR que reconoce el antígeno. Se conocen numerosos dominios de unión a antígeno en la técnica, incluidos 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 de cadena sencilla (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal; un ligando natural del antígeno diana; un péptido con suficiente afinidad por la diana; un anticuerpo de un solo dominio; un ligante artificial simple como Darpin (proteína repetida de anquirina diseñada); o una cadena sencilla derivada de un receptor de linfocitos T.

El dominio de unión a antígeno puede comprender un dominio que no está basado en el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede comprender un dominio basado en una proteína/péptido que es un ligando soluble para un receptor de la superficie celular (por ejemplo, un péptido soluble, tal como una citocina o una quimiocina); o un dominio extracelular de un ligando anclado a la membrana o un receptor para el que el par de unión se expresa en la célula tumoral.

El dominio de unión a antígeno puede basarse en un ligando natural del antígeno. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede comprender APRIL, el ligando natural de BCMA.

5 El dominio de unión a antígeno puede comprender un péptido de afinidad de una biblioteca combinatoria o una proteína/péptido de afinidad diseñada de novo.

DOMINIO ESPACIADOR

10 Los CAR comprenden una secuencia espaciadora para conectar el dominio de unión al antígeno con el dominio transmembrana y separar espacialmente el dominio de unión al antígeno del endodominio. Un espaciador flexible permite que el dominio de unión a antígeno se oriente en diferentes direcciones para posibilitar la unión.

15 El primer y segundo CAR codificados por la construcción de ácido nucleico de la invención comprende moléculas espaciadoras de diferente tamaño. Por ejemplo, la secuencia espaciadora puede comprender, por ejemplo, una región Fc de IgG1, una bisagra IgG1 o un pedúnculo de CD8 humano o el pedúnculo de CD8 de ratón. El espaciador puede comprender, como alternativa, una secuencia enlazadora alternativa que tiene longitud y/o propiedades espaciadoras de dominios similares como una región Fc de IgG1, una bisagra de IgG1 o un pedúnculo de CD8. Un espaciador de IgG1 humana puede alterarse para eliminar los motivos de unión a Fc.

20 Los ejemplos de secuencias de aminoácidos para estos espaciadores se dan a continuación:

SEQ ID NO: 7 (bisagra-CH2CH3 de IgG1 humana)
 AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCWVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 25 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL
 DSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD

SEQ ID NO: 8 (pedúnculo de CD8 humana):
 TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

30 SEQ ID NO: 9 (bisagra de IgG1 humana):
 AEPKSPDKTHTCPPCKDPK

SEQ ID NO: 10 (ectodominio de CD2)
 KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSDDKKIAQFRKEKETFFKEKDYKLF
 35 KNGTLKIKHLKTDQDIYKVSIDYDTKGNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTCINTTLTCEVMNG
 TDPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAKFKCTAGNKVSKESSVEPVSCP EKGLD

SEQ ID NO 11 (ectodominio de CD34)
 SLDNNGTATPELPTQGTFNSVSTNVSYQETTPSTLGGSTSLHPVSQHGNEATTNITETTVKF
 40 TSTSVITSVYGTNSSVQSQTSTVSTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATS
 PTKPYTSSSPILSDIAEKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKDRGEGLARVLCGEEQ
 ADADAGAQCVCVLLLAQSEVRPQCLLLVLANRTEISSKLQMLKHKHSDLKKLGILDFTEQDVA
 SHQSYSQKT

45 Dado que los CAR son típicamente homodímeros (véase la Figura 1a), el apareamiento cruzado puede dar como resultado un receptor de antígeno quimérico heterodimérico. Esto no es deseable por varias razones, por ejemplo: (1) el epítipo puede no estar al mismo "nivel" en la célula diana, de modo que un CAR cruzado solo puede unirse a un antígeno; (2) el VH y el VL de los dos scFv diferentes podrían intercambiarse y no reconocer la diana o peor aún reconocer un antígeno inesperado e impredecible.

50 Para la puerta Y, es importante que el espaciador del primer CAR tenga una longitud y/o carga y/o forma y/o configuración y/o glicosilación diferentes, de modo que cuando el primer y segundo CAR se unan a su antígeno diana, la diferencia en la carga o dimensiones del espaciador de como resultado la separación espacial de los dos tipos de CAR en diferentes partes de la membrana para que se produzca la activación según lo predicho por el modelo de separación cinética. En la construcción de la presente invención, por lo tanto, la diferente longitud, forma y/o configuración de los espaciadores se elige cuidadosamente teniendo en cuenta el tamaño y el epítipo de unión en el antígeno diana para permitir la segregación diferencial en el reconocimiento de dianas afines. Por ejemplo, se espera que la bisagra de IgG1, el pedúnculo de CD8, el Fc de IgG1, el ectodominio de CD34, y el ectodominio de CD45 segreguen diferencialmente.

60 En la siguiente tabla se muestran ejemplos de pares espaciadores que segregan diferencialmente y, por lo tanto, son adecuados para su uso con la puerta Y:

Espaciador de CAR estimulador	Espaciador de CAR inhibidor
CD8STK humano	IgG-Bisagra-CH2CH3 humano
Ectodominio de CD3z humano	IgG-Bisagra-CH2CH3 humano
IgG-Bisagra humano	IgG-Bisagra-CH2CH3 humano
CD28STK humano	IgG-Bisagra-CH2CH3 humano
CD8STK humano	IgM-Bisagra-CH2CH3CD4 humano
Ectodominio de CD3z humano	IgM-Bisagra-CH2CH3CD4 humano
IgG-Bisagra humano	IgM-Bisagra-CH2CH3CD4 humano
CD28STK humano	IgM-Bisagra-CH2CH3CD4 humano

Las dimensiones relativas de algunos espaciadores de uso común se ilustran en la Figura 13. La Figura 14 muestra una matriz de pares espaciadores y su idoneidad para usar con una puerta Y.

- 5 Todos los dominios espaciadores mencionados anteriormente forman homodímeros. Sin embargo, el mecanismo no se limita al uso de receptores homodiméricos y debería funcionar con receptores monoméricos siempre que el espaciador sea suficientemente rígido. Un ejemplo de dicho espaciador es CD2 o CD22 truncado.

DOMINIO TRANSMEMBRANA

- 10 El dominio transmembrana es la secuencia del CAR que se extiende por la membrana.

15 Un dominio transmembrana puede ser cualquier estructura de proteína que sea termodinámicamente estable en una membrana. Esto es típicamente una hélice alfa que comprende varios restos hidrófobos. El dominio transmembrana de cualquier proteína transmembrana se puede usar para suministrar la porción transmembrana de la invención. Los expertos en la materia pueden determinar la presencia y la extensión de un dominio transmembrana de una proteína utilizando el algoritmo TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). Adicionalmente, dado que el dominio transmembrana de una proteína es una estructura relativamente simple, es decir, una secuencia de polipéptidos prevista para formar una hélice alfa hidrófoba de longitud suficiente para abarcar la membrana, también se puede usar un dominio TM diseñado artificialmente (el documento US 7052906 B1 describe componentes transmembrana sintéticos).

El dominio transmembrana puede obtenerse de CD28, que da una buena estabilidad de receptor.

25 ENDODOMINIO DE ACTIVACIÓN

30 El endodominio es la parte de transmisión de señales del CAR. Después del reconocimiento de antígeno, el grupo de receptores, los CD45 y CD148 naturales se excluyen de la sinapsis y se transmite una señal a la célula. El componente de endodominio más habitualmente usado es el 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 puede necesitarse una señalización coestimuladora adicional. Por ejemplo, pueden usarse CD28 y OX40 quiméricos con CD3-Zeta para transmitir una señal proliferativa/de supervivencia, o pueden usarse los tres conjuntamente.

35 En la "puerta Y" de la presente invención, la célula comprende al menos dos CAR, al menos uno de los cuales es un CAR activador que comprende o se asocia con un endodominio activador. Un endodominio activador puede, por ejemplo, comprender solo el endodominio de CD3-Zeta, 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.

40 Cualquier endodominio que contenga un motivo ITAM puede actuar como un endodominio de activación en la presente invención. Se sabe que varias proteínas contienen endodominios con uno o más motivos ITAM. Ejemplos de tales proteínas incluyen la cadena epsilon de CD3, la cadena gamma de CD3 y la cadena delta de CD3, por nombrar algunas. El motivo ITAM puede reconocerse fácilmente como una tirosina separada de una leucina o isoleucina por otros dos aminoácidos, dando la firma YxxL/I. Normalmente, pero no siempre, dos de estos motivos están separados por entre 6 y 8 aminoácidos en la cola de la molécula (YxxL/Ix(6-8)YxxL/I). Por lo tanto, un experto en la materia puede encontrar fácilmente proteínas existentes que contienen uno o más ITAM para transmitir una señal de activación. Adicionalmente, dado que el motivo es simple y no se requiere una estructura secundaria compleja, los expertos en la materia pueden diseñar polipéptidos que contengan ITAM artificiales para transmitir la señal de activación (véase el documento WO 2000063372, que se refiere a moléculas de señalización sintéticas).

50 El dominio de señalización de linfocitos T transmembrana e intracelular (endodominio) de un CAR con un endodominio activador puede comprender la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 12, 13 o 14 o una variante de la misma que tenga al menos un 80 % de identidad de secuencia.

SEQ ID NO: 12 que comprende el dominio transmembrana de CD28 y el endodominio de CD3 Z
 FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
 DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLY
 QGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

5

SEQ ID NO: 13 que comprende el dominio transmembrana CD28 y los endodominios de CD28 y CD3 Zeta
 FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP
 RDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
 KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALP
 PR

10

SEQ ID NO: 14 que comprende el dominio transmembrana de CD28 y CD28, endodominios de OX40 y CD3 Zeta.
 FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP
 RDFAAYRSRDLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQG
 QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
 MKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

15

Una secuencia variante puede tener al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12, 13 o 14, con la condición de que la secuencia proporcione un dominio transmembrana eficaz y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T eficaz.

20

ENDODOMINIO INHIBIDOR EN "AUSENCIA DE LIGADURA"

En la puerta Y de la presente invención, uno de los CAR comprende un endodominio inhibidor, de tal modo que el CAR inhibidor inhibe la activación de linfocitos T por el CAR activador en ausencia de ligadura del CAR inhibidor, pero no inhibe significativamente la activación de linfocitos T por el CAR activador cuando el CAR inhibidor está ligado. Este se denomina un endodominio inhibidor en "ausencia de ligadura".

25

En este caso, el espaciador del CAR inhibidor tiene un tamaño diferente del espaciador del CAR activador, de modo que cuando ambos receptores están ligados, la diferencia en las dimensiones del espaciador da como resultado el aislamiento de los

30

CAR activadores y los CAR inhibidores en diferentes compartimentos de membrana de la sinapsis inmunológica, de modo que el endodominio activador se libera de la inhibición por el endodominio inhibidor.

35

Por lo tanto, los endodominios inhibidores para su uso en un CAR inhibidor en ausencia de ligadura pueden comprender cualquier secuencia que inhiba la señalización de linfocitos T por el CAR activador cuando está en el mismo compartimento de membrana (es decir, en ausencia del antígeno para el CAR inhibidor) pero que no inhibe significativamente la señalización de linfocitos T cuando se aísla en una parte separada de la membrana del CAR inhibidor.

40

El endodominio inhibidor en ausencia de ligadura puede ser o comprender una tirosina fosfatasa, tal como una tirosina fosfatasa de tipo receptor. Un endodominio inhibidor puede ser o comprender cualquier tirosina fosfatasa que sea capaz de inhibir la señalización de TCR cuando solo se liga el receptor estimulante. Un endodominio inhibidor puede ser o comprender cualquier tirosina fosfatasa con una velocidad catalítica suficientemente rápida para que los ITAM fosforilados sean capaces de inhibir la señalización de TCR cuando solo se liga el receptor estimulador.

45

Por ejemplo, el endodominio inhibidor de una puerta Y puede comprender el endodominio de CD148 o CD45. Se ha visto que CD148 y CD45 actúan de forma natural en las tirosinas fosforiladas aguas arriba de la señalización del TCR.

50

CD148 es una proteína tirosina fosfatasa de tipo receptor que regula negativamente el TCR interfiriendo con la fosforilación y la función de PLC γ 1 y LAT.

CD45 presente en todas las células hematopoyéticas, es una proteína tirosina fosfatasa que es capaz de regular la transducción de señales y las respuestas funcionales, de nuevo mediante la fosforilación de PLC γ 1.

55

Un endodominio inhibidor puede comprender la totalidad o parte de una tirosina fosfatasa de tipo receptor. La fosfatasa puede interferir con la fosforilación y/o la función de elementos involucrados en la señalización de linfocitos T, tal como PLC γ 1 y/o LAT.

60

El segmento transmembrana y el endodominio de CD45 y CD148 se muestran como la SEQ ID NO: 15 y 16, respectivamente.

SEQ ID NO: 15 - secuencia del segmento transmembrana y endodominio de CD45
 ALIAFLAFLIIVTSIALLVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELVERDDEKQLMNVPEPIHADILLETYK
 RKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFIKEARKPFNQKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSN

65

YINASYIDGFKPRKYIAAQGPRDETVDFFWRMIWEQKATVIVMVTRCEEGRNKCAYEYWP
 SMEEGTRAFGDVWVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGVDPEDPH
 LLLKLRRRVNFAFSNFFSGPIVVHCSAGVGRGTGYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRRO
 5 RCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSLHYPYLHNMKKRDPPESESPLEAEFQRLP
 SYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDSDSE
 EPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKVKVIVMLTELKHGDQEIQAQ
 YWGEQKQTYGDIEVDLKDSTDSTYTLRVFELRHRSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEP
 KELISMIQVVKQLPQKNSSEGNKHHKSTPLLIHCRDGSQQTGIFCALLNLESAETEEVVDI
 10 FQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASSTYPAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQ
 DANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALNQQS

SEQ ID NO: 16 - secuencia del segmento transmembrana y endodominio de CD148
 AVFGCIFGALVIVTVGGFIFWRKKRDKAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQADSN
 CGFAEEYEDLKLVISQPKYAAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYM
 15 PGYHSKKDFIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLTKCQEGRTKCEEYWPSKQAQD
 YGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSSEHPLRQFHFTSWPDHGVPTDLDLLINFRYLVR
 DYMKQSPPEPILVHCSAGVGRGTGTFIAIDRLIYQIENENTVDVYGIVYDLRMHRPLMVQTED
 QYVFLNQCVLDIRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA

20 Un CAR inhibidor puede comprender la totalidad o parte de la SEQ ID NO: 15 o 16 (por ejemplo, puede comprender la función fosfatasa del endodominio). Puede comprender una variante de la secuencia o parte de la misma que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia, siempre que la variante conserve la capacidad de inhibir basalmente la señalización de linfocitos T por el CAR activador.

25 Se pueden probar otros espaciadores y endodominios, por ejemplo, usando el sistema modelo ejemplificado en la presente memoria. Las poblaciones de células diana se pueden crear transduciendo una línea celular adecuada, como una línea celular SupT1, ya sea de forma individual o doble para establecer células negativas para ambos antígenos (el tipo silvestre), positivas para uno de ellos y positivas para ambos (por ejemplo, CD19-CD33-, CD19+CD33-, CD19-
 30 CD33+ y CD19+CD33+). Los linfocitos T como la línea de linfocitos T de ratón BW5147 que libera IL-2 tras la activación pueden transducirse con pares de CAR y su capacidad para funcionar en una puerta lógica se mide mediante la medición de la liberación de IL-2 (por ejemplo, mediante ELISA). Por ejemplo, se muestra en el Ejemplo 4 que los endodominios CD148 y CD45 pueden funcionar como CAR inhibidores en combinación con un CAR activador que contiene un endodominio CD3 Zeta. Estos CAR se basan en un espaciador de pedúnculo de CD8 corto/no voluminoso en un CAR y un espaciador Fc voluminoso en el otro CAR para lograr la actividad de puerta Y. Cuando ambos
 35 receptores están ligados, la diferencia en las dimensiones del espaciador da como resultado el aislamiento de los diferentes receptores en diferentes compartimientos de membrana, liberando al receptor CD3 Zeta de la inhibición por los endodominios de CD148 o CD45. De esta manera, la activación solo se produce una vez que los receptores se han activado. Realmente se puede ver que este sistema modular puede usarse para analizar pares de espaciadores alternativos y endodominios inhibidores. Si los espaciadores no consiguen el aislamiento después de la ligadura de
 40 ambos receptores, la inhibición no se liberaría y, por lo tanto, no se produciría ninguna activación. Si el endodominio inhibidor a prueba es ineficaz, se esperaría la activación en presencia de ligadura del CAR activador, independientemente del estado de ligadura del CAR inhibidor.

SITIO DE ESCISIÓN

45 La presente construcción de ácido nucleico comprende una secuencia que codifica un sitio de escisión situado entre secuencias de ácido nucleico que codifican el primer y segundo CAR, de modo que el primer y el segundo CAR pueden expresarse como entidades separadas.

50 El sitio de escisión puede ser cualquier secuencia que permita que el polipéptido que comprende el primer y segundo CAR se separe.

El término "escisión" se usa en el presente documento por conveniencia, pero el sitio de escisión puede provocar que el primero y segundo CAR se separen en entidades individuales por un mecanismo que no sea la escisión clásica. Por
 55 ejemplo, para el péptido autoescindible del virus de la fiebre aftosa (FMDV) 2A (véase más adelante), 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 está localizado entre las secuencias de ácido nucleico que codifican el primer y segundo CAR, haga que el primer y
 60 segundo CAR se expresen como entidades separadas.

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

65 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 proparatiroidea, el precursor del factor de crecimiento transformante beta 1, la proalbúmina, la pro-beta-secretasa, la metaloproteínasa de matriz de membrana de tipo 1, la subunidad beta del profactor de crecimiento nervioso y el factor von Willebrand. La furina escinde proteínas justo cadena abajo de una secuencia diana de aminoácidos básicos (canónicamente, Arg-X-(Arg/lys)-Arg') y es 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 modo que cuando se produce el polipéptido que comprende el primer y segundo CAR y el péptido autoescindible, se "escinde" inmediatamente o se separa en un primer y segundo CAR 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 (FMDV) y el virus de la rinitis equina A, la región 2A es una sección corta de aproximadamente 18 aminoácidos, que, junto con el residuo N-terminal de la proteína 2B (un resto de prolina conservado) representa un elemento autónomo capaz de mediar la "escisión" en su propio C-terminal.

Los 19 aminoácidos C-terminales de la proteína de cardiovirus más larga, junto con la prolina N-terminal de 2B median la "escisión" con una eficacia aproximadamente igual a la secuencia del aftovirus FMDV 2a. Los cardiovirus incluyen el virus de la encefalomiocarditis (EMCV) y el virus de la encefalitis murina de Theiler (TMEV).

El análisis mutacional de EMCV y FMDV 2A ha revelado que el motivo DxExNPGP está íntimamente implicado en la actividad de "escisión" (Donnelly et al (2001) como anteriormente).

El sitio de escisión de la presente invención puede comprender la secuencia de aminoácidos: Dx₁Ex₂NPGP, donde x₁ y x₂ son cualquier aminoácido. X₁ puede seleccionarse del siguiente grupo: I, V, M y S. X₂ puede seleccionarse del siguiente grupo: T, M, S, L, E, Q y F.

Por ejemplo, el sitio de escisión puede comprender una de las secuencias de aminoácidos mostradas en la Tabla 6.

Tabla 6

Motivo	Presente en:
DIETNPGP	Picornavirus EMCB, EMCD, EMCPV21
DVETNPGP	Picornavirus MENG0 y TMEBEAN; Virus de insectos DCV, ABPV
DVEMNPGP	Picornavirus TMEGD7 y TMEBEAN
DVESNPGP	Picornavirus FMDA10, FMDA12, FMDC1, FMD01K, FMDSAT3, FMDVSAT2, ERAV; Virus de insectos CrPV
DMESNPGP	Picornavirus FMDV01G
DVELNPGP	Picornavirus ERBV; Rotavirus porcino
DVEENPGP	Picornavirus PTV-1; Virus de insectos TaV; Trypanosoma TSR1
DIELNPGP	Rotavirus bovino, rotavirus humano
DIEQNPGP	AP endonucleasa de Trypanosoma
DSEFNPGP	Secuencia bacteriana <i>T. maritima</i>

El sitio de escisión, basado en una secuencia 2A puede tener, por ejemplo 15-22 aminoácidos de longitud. La secuencia puede comprender el extremo C-terminal de una proteína 2A, seguido de un resto de prolina (que corresponde a la prolina N-terminal de 2B).

Los estudios de mutaciones también han demostrado que, además de las secuencias 2A naturales, algunas variantes también son activas. El sitio de escisión puede corresponder a una secuencia variante de un polipéptido 2A de origen natural, que tiene una, dos o tres sustituciones de aminoácidos, que retiene la capacidad de inducir la "escisión" de una secuencia de poliproteína en dos o más proteínas separadas.

La secuencia de escisión puede seleccionarse de las siguientes que todas han demostrado en cierta medida ser activas (Donnelly *et al* (2001) como anteriormente):

5 LLNFDLLKLAGDVESNPGP
 LLNFDLLKLAGDVQSNPGP
 LLNFDLLKLAGDVEINPGP
 LLNFDLLKLAGDVEFNPGP
 LLNFDLLKLAGDVESHGPGP
 10 LLNFDLLKLAGDVESEPGP
 LLNFDLLKLAGDVESQPGP
 LLNFDLLKLAGDVESNPGG

15 Basándose en la secuencia del motivo DxExNPGP, se han descubierto secuencias "similares a 2A" en picornavirus que no son 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 similar a 2A, tales como:

20 YHADYYKQRLIHDVEMNPGP
 HYAGYFADLLIHDITNPGP
 QCTNYALLKLAGDVESNPGP
 ATNFSLLKQAGDVEENPGP
 AARQMLLLSGDVETNPGP
 25 RAEGRGSLLTCGDVEENPGP
 TRAEIEDELIRAGIESNPGP
 TRAEIEDELIRADIESNPGP
 AKFQIDKILISGDVELNPGP
 30 SSIIRTKMLVSGDVEENPGP
 CDAQRQKLLLSGDIEQNPGP
 YPIDFGGFLVKADSEFNPGP

El sitio de escisión puede comprender la secuencia similar a 2A RAEGRGSLLTCGDVEENPGP.

35 Se ha demostrado que incluir una "extensión" N-terminal de entre 5 y 39 aminoácidos puede aumentar la actividad (Donnelly *et al* (2001) como anteriormente). En particular, la secuencia de escisión puede comprender una de las siguientes secuencias o una variante de la misma que tiene, por ejemplo, hasta 5 cambios de aminoácidos que retienen la actividad del sitio de escisión:

40 VTELLYRMKRAETY CPRPLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
 LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
 EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
 APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

45 SEÑAL DE RETENCIÓN INTRACELULAR

La construcción de ácido nucleico de la presente invención puede comprender una secuencia que codifica un CAR que comprende una señal de retención intracelular.

50 El direccionamiento de proteínas o la clasificación de proteínas es el mecanismo biológico por el cual las proteínas son transportadas a los destinos apropiados en la célula o fuera de ella. Las proteínas pueden dirigirse al espacio interior de un orgánulo, diferentes membranas intracelulares, membrana plasmática o al exterior de la célula mediante secreción. Este proceso de transporte se lleva a cabo basándose en la información de secuencia contenida en la propia proteína.

55 Las proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático (ER) rugoso de las células eucariotas utilizan la vía exocítica para el transporte a sus destinos finales. Las proteínas que carecen de señales de clasificación especiales son transportadas vectorialmente desde el ER a través del aparato de Golgi y la red trans-Golgi (TGN) a la membrana plasmática. Otras proteínas tienen señales de direccionamiento para su incorporación a orgánulos específicos de la vía exocítica, como los endosomas y los lisosomas.

60 Los lisosomas son orgánulos ácidos en los que las macromoléculas endógenas e internalizadas son degradadas por las hidrolasas lumenales. Las macromoléculas endógenas alcanzan el lisosoma al ser clasificadas en la TGN desde donde son transportadas a los endosomas y luego a los lisosomas.

65 La presente invención puede explotar las señales de direccionamiento utilizadas por una célula para clasificar

proteínas en la ubicación intracelular correcta. Las señales pueden clasificarse ampliamente en los siguientes tipos:

- i) señales de endocitosis
- ii) señales de retención en el Golgi
- iii) señales de reciclaje en la TGN
- iv) señales de retención en el ER
- v) señales de clasificación lisosomal

La 'señal de retención intracelular' se refiere a una secuencia de aminoácidos que dirige la proteína en la que está incluida a un compartimento celular distinto de la membrana de la superficie celular o al exterior de la célula.

La señal de retención intracelular provoca una reducción en la cantidad de CAR expresada en la superficie de una célula en comparación con un CAR de control equivalente, u otra proteína transmembrana de control que no comprende una señal de retención intracelular.

En otras palabras, la proporción de CAR traducido que comprende una señal de retención intracelular que se expresa en la superficie celular es menor que la proporción de una cantidad equivalente de un CAR de control traducido, equivalente u otra proteína transmembrana que no comprende una señal de retención intracelular.

Por ejemplo, la cantidad del CAR que comprende una señal de retención intracelular que se expresa sobre la superficie de una célula puede ser menos de 75 %, menos de 50 %, menos de 25 % o menos de 10 % de la cantidad de un CAR de control equivalente u otra proteína transmembrana que no comprende una señal de retención intracelular.

Las construcciones que expresan una poliproteína que se escinde posteriormente por una proteasa generalmente están limitadas por el hecho de que la expresión de los péptidos a partir de la poliproteína se limita a una relación 1:1. Sin embargo, en la presente invención, la inclusión de una señal de retención intracelular en el CAR significa que su expresión en la superficie celular puede ser modulada (por ejemplo, reducida en comparación con un CAR de control equivalente u otra proteína transmembrana que no comprende una señal de retención intracelular). Como tal, la proporción de CAR que comprende la señal de retención intracelular expresada en la superficie celular en comparación con la expresión del segundo CAR expresado en la poliproteína puede ser, por ejemplo aproximadamente 1:1,5, de 1:1,5-1:2, 1:2-1:3, 1:3-1:4, 1:4-1:5, o más de 1:5.

La cantidad de un CAR expresado en la superficie de una célula puede determinarse usando métodos que son conocidos en la técnica, por ejemplo citometría de flujo o microscopia de fluorescencia.

La señal de retención intracelular puede apartar al CAR de la vía secretora durante la translocación desde el ER.

La señal de retención intracelular puede dirigir el CAR a un compartimento o complejo intracelular. La señal de retención intracelular puede dirigir el CAR a un compartimento intracelular unido a la membrana.

Por ejemplo, la señal de retención intracelular puede dirigir el CAR a un compartimento lisosomal, endosomal o de Golgi (red trans-Golgi, 'TGN').

Dentro de una célula normal, las proteínas que surgen de la biogénesis o la vía endocítica se clasifican en el compartimento intracelular apropiado después de un conjunto secuencial de decisiones de clasificación. En la membrana plasmática, las proteínas pueden permanecer en la superficie celular o ser internalizadas en los endosomas. En la TGN, la elección está entre ir a la membrana plasmática o ser desviado a los endosomas. En los endosomas, las proteínas pueden reciclarse a la membrana plasmática o ir a los lisosomas. Estas decisiones se rigen por la clasificación de las señales en las propias proteínas.

Los lisosomas son orgánulos celulares que contienen enzimas hidrolasas ácidas que descomponen los materiales de desecho y los desechos celulares. La membrana alrededor de un lisosoma permite que las enzimas digestivas trabajen al pH que requieren. Los lisosomas se fusionan con las vacuolas autofágicas (fagosomas) y dispensan sus enzimas en las vacuolas autofágicas, digiriendo su contenido.

Un endosoma es un compartimento limitado por membrana dentro de las células eucariotas. Es un compartimento de la vía de transporte de la membrana endocítica desde la membrana plasmática al lisosoma y proporciona un entorno para clasificar el material antes de que llegue al lisosoma degradante. Los endosomas pueden clasificarse como endosomas tempranos, endosomas tardíos o endosomas de reciclaje, dependiendo del tiempo que tarde el material endocitosado en llegar a ellos. La señal de retención intracelular usada en la presente invención puede dirigir la proteína a un compartimento endosomal tardío.

El aparato de Golgi es parte del sistema de endomembrana celular, el aparato de Golgi empaqueta proteínas dentro de la célula antes de enviarlas a su destino; es particularmente importante en el procesamiento de proteínas para la secreción.

- 5 Existe un considerable conjunto de conocimientos que ha surgido de los estudios que investigan las señales de clasificación presentes en proteínas conocidas y el efecto de alterar su secuencia y/o posición dentro de la molécula (Bonifacino and Traub (2003) *Ann. Rev. Biochem.* 72:395-447; Braulke and Bonifacino (2009) *Biochimica and Biophysica Acta* 1793:605-614; Griffith (2001) *Current Biology* 11:R226-R228; Mellman and Nelson (2008) *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:833-845; Dell'Angelica and Payne (2001) *Cell* 106:395-398; Schafer y col. (1995) *EMBO J.* 14:2424-2435; Trejo (2005) *Mol. Pharmacol.* 67:1388-1390). Numerosos estudios han demostrado que es posible insertar una o más señales de clasificación en una proteína de interés para alterar la ubicación intracelular de una proteína de interés (Pelham (2000) *Meth. Enzymol.* 327:279-283).
- 10 Por lo tanto, es perfectamente posible seleccionar una señal de clasificación que tenga una propiedad de localización deseada e incluirla dentro de una proteína de interés para dirigir la ubicación intracelular de esa proteína. En relación con la presente solicitud, por lo tanto, es posible seleccionar una señal de clasificación que tenga la cantidad deseada de reducción de la expresión en la membrana plasmática.
- 15 La posición óptima de la señal de clasificación en la proteína naciente de interés puede depender del tipo de proteína transmembrana (es decir, los tipos I-IV) y de si el extremo C está en el lado luminal o citoplasmático de la membrana (Goder and Spiess (2001) *FEBS Lett* 504:87-93). Esto puede determinarse fácilmente considerando la posición de la señal de clasificación en su proteína natural.
- 20 Los ejemplos de señales de endocitosis incluyen las del receptor de transferrina y el receptor de asialoglicoproteína.
- Los ejemplos de señales que provocan el reciclaje TGN-endosoma incluyen aquellas que forman proteínas tales como los CI-MPR y CD-MPR, sortilina, las proteínas relacionadas con el receptor de LDL LRP3 y LRP10 y la β -secretasa, GGA1-3, LIMP-II, NCP1, mucolipn-1, sialina, GLUT8 y la cadena invariante.
- 25 Los ejemplos de señales de retención en la TGN incluyen las de las siguientes proteínas que están localizadas en la TGN: las enzimas de procesamiento de prohormonas furina, PC7, CPD y PAM; la glicoproteína E del herpesvirus 3 y TGN38.
- 30 Los ejemplos de señales de retención en el ER incluyen señales C-terminales tales como KDEL, KKXX o KXKXX y el motivo RXR(R) de los canales de potasio. Las proteínas del ER conocidas incluyen la proteína de adenovirus E19 y ERGIC53.
- 35 Los ejemplos de señales de clasificación lisosomal incluyen las que se encuentran en las proteínas de membrana lisosomal, tales como LAMP-1 y LAMP-2, CD63, CD68, endolina, DC-LAMP, cistinosina, intercambiador de fosfato de azúcar 2 y fosfatasa ácida.
- AJUSTABILIDAD
- 40 La expresión relativa de uno o ambos CAR puede ajustarse utilizando los métodos descritos en la presente memoria por diversos métodos, tales como
- a) alterar la posición de la señal de retención intracelular en la molécula de proteína; y/o
- b) seleccionar una señal de retención intracelular particular.
- 45 La opción a) se analiza con más detalle más adelante.
- Con respecto a la opción b), se encuentra disponible una variedad de señales de retención intracelular a partir de la gran cantidad de proteínas naturales que se clasifican a las distintas ubicaciones celulares dentro de las células eucariotas. También es posible usar señales de retención intracelular "sintéticas" que comprenden uno o más de los motivos que se encuentran en las proteínas naturales (véase la siguiente sección) y tienen una función de señal de clasificación similar.
- 50 Está disponible una cascada de intensidad de señal, dependiendo de la ubicación intracelular a la que la señal de clasificación envía la proteína relevante. En términos generales, cuanto más "intracelular" es la ubicación dirigida por la señal de clasificación, más "fuerte" es la señal en términos de disminución de la expresión relativa de la proteína.
- 55 Cuando una señal de clasificación dirige una proteína al compartimento lisosomal, la proteína es internalizada y degradada por la célula, lo que da como resultado un escape relativamente pequeño a la superficie celular. La proteína se degrada y se pierde del sistema una vez que entra en el lisosoma. Por lo tanto, las señales de clasificación lisosomal, tales como LAMP1, son las "más fuertes" en términos de reducción de la expresión relativa en la superficie celular.
- 60 Cuando una señal de clasificación dirige una proteína para ser retenida en el ER, solo una proporción muy pequeña de la proteína llega a la superficie celular. Por lo tanto, las señales de retención o reciclaje del ER, tales como la señal ERGIC-53 y KKFF son las siguientes más fuertes, en términos de reducción de la expresión relativa en la superficie
- 65

celular.

5 Cuando una señal de clasificación dirige una proteína a los compartimentos endosomal, de Golgi o de la TGN, es probable que la proteína se recicle en cierta medida entre la TGN, el compartimento endosomal y la membrana plasmática. Estas señales proporcionan un nivel más limitado de reducción de la expresión ya que una proporción significativa de la proteína aún alcanzará la membrana plasmática.

10 En general, la reducción en la expresión vista con señales de clasificación conocidas se puede resumir de la siguiente manera: Señales de clasificación lisosomal>señales de retención/reciclaje en el ER>señales de retención/reciclaje en la TGN>señales de endocitosis.

15 La ajustabilidad usando diferentes señales de clasificación y/o diferentes posiciones de señales de clasificación dentro de la proteína es especialmente útil cuando se considera la expresión de múltiples proteínas, cada una con su propia expresión relativa. Por ejemplo, si se considera una construcción de ácido nucleico que tiene la siguiente estructura: A-X-B-Y-C en la cual

A, B y C son secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos; y X e Y son secuencias de ácidos nucleicos que codifican sitios de escisión.

20 La construcción de ácido nucleico codificará tres proteínas A, B y C, cualquiera de las cuales pueden ser CAR. Por ejemplo, B y C pueden ser CAR que comprenden una señal de retención intracelular. Si se desea que A, B y C se expresen de tal manera que los niveles relativos sean $A > B > C$, entonces la secuencia de ácido nucleico A puede no tener señal de retención intracelular, la secuencia de ácido nucleico B puede tener una señal de retención intracelular que provoque que una pequeña proporción de proteína B sea retenida en la célula (es decir, que no se exprese en la superficie celular), y la secuencia de ácido nucleico C puede tener una señal de retención intracelular que provoque que una gran proporción de proteína C sea retenida en la célula.

30 Como se explica a continuación, se pueden lograr cantidades diferentes de retención intracelular, que conducen a diferentes cantidades de expresión en la superficie celular:

- (a) usando diferentes señales de retención intracelular para las proteínas; y/o
- (b) teniendo la señal de retención intracelular localizada en una posición diferente en las proteínas.

35 TIPOS DE SEÑAL

En la técnica se conocen numerosas proteínas que incluyen una señal de retención intracelular y se dirigen a un compartimento intracelular.

40 La señal de retención intracelular puede ser una señal de retención de una proteína que reside en el compartimento lisosomal, endosomal o del aparato de Golgi.

Las señales de retención intracelular son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Bonifacino & Traub; Annu. Rev. Biochem.; 2003; 72; 395-447).

45 La señal de retención intracelular puede, ser una señal de clasificación basada en tirosina, una señal de clasificación basada en dileucina, una señal de grupo ácido, una señal de evitación lisosomal, una señal tipo NPF $X'(1,2)D$, una señal KDEL, K $KX'X'$ o K $X'KX'X'$ (en la que X' es cualquier aminoácido).

50 Las señales de clasificación basadas en tirosina median la internalización rápida de las proteínas transmembrana de la membrana plasmática y el direccionamiento de las proteínas a los lisosomas (Bonifacino & Traub; como anteriormente). Dos tipos de señales de clasificación basadas en tirosina están representados por los motivos de consenso NPX'Y y YX'X'Z' (en el que Z' es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba voluminosa).

55 Las señales NPX'Y se han desarrollado para mediar la internalización rápida de las proteínas transmembrana tipo I, se producen en familias, tales como los miembros del receptor LDL, la integrina β , y las familias de la proteína precursora de β -amiloide.

Ejemplos de señales NPX'Y se proporcionan en la Tabla 7.

Tabla 7 - Señales NPX'Y

Proteína	Especie	Secuencia
Receptor LDL	Humana	Tm-10-INFDPNPVYQKTT-29
LRP1 (1)	Humana	Tm-21-VEIGNPTYKMYE-64
LRP1 (2)	Humana	Tm-55-TNFTNPVYATLY-33
LRP1	<i>Drosophila</i>	Tm-43-GNFANPVYESMY-38
LRP1 (1)	<i>C. elegans</i>	Tm-54-TTFTNPVYELED-91
LRP1 (2)	<i>C. elegans</i>	Tm-140-LRVDNPLYDPDS-4
Megalina (1)	Humana	Tm-70-IIFENPMYSARD-125
Megalina (2)	Humana	Tm-144-TNFENPIYAQME-53
Integrina 13-1 (1)	Humana	Tm-18-DTGENPIYKSAV-11
Integrina 13-1 (2)	Humana	Tm-30-TTVVNPKEYEGK
Integrina 13 (1)	<i>Drosophila</i>	Tm-26-WDTENPIYKQAT-11
Integrina 13 (2)	<i>Drosophila</i>	Tm-35-STFKNPMYAGK
APLP1	Humana	Tm-33-HGYENPTYRFLE-3
APP	Humana	Tm-32-NGYENPTYKFFE-4
Similar a APP	<i>Drosophila</i>	Tm-38-NGYENPTYKYFE-3
Receptor de insulina	Humana	Tm-36-YASSNPEYLSAS-379
Receptor EGR (1)	Humana	Tm-434-GSVQNPVYHNQP-96
Receptor EGR (2)	Humana	Tm-462-TAVGNPEYLNTV-68
Receptor EGR (3)	Humana	Tm-496-ISLDNPDYQQDF-34

Los números entre paréntesis indican motivos que están presentes en más de una copia dentro de la misma proteína. Las señales en esta y otras tablas deben considerarse ejemplos. Los restos clave se indican en negrita. Se indican los números de aminoácidos antes (es decir, amino terminal) y después (es decir, carboxi terminal) de las señales. Abreviaturas: Tm, transmembrana; LDL, lipoproteína de baja densidad; LRP1, proteína relacionada con el receptor LDL 1; APP, proteína precursora de amiloide 13; APLP1, Proteína similar a APP 1.

5 Las señales de tipo YX'X'Z' se encuentran en receptores endocíticos tales como el receptor de transferrina y el receptor de asialoglicoproteína, receptores de clasificación intracelular como los CI-MPR y CD-MPR, proteínas de membrana lisosomales tales como LAMP-1 y LAMP-2, y proteínas TGN tales como TGN38 y furina, así como en proteínas localizadas en orgánulos endosomales-lisosomales especializados tales como compartimentos de procesamiento de antígeno (por ejemplo, HLA-DM) y gránulos citotóxicos (por ejemplo, GMP-17). Las señales de tipo YX'X'Z' están involucradas en la internalización rápida de proteínas de la membrana plasmática. Sin embargo, su función no se limita a la endocitosis, ya que los mismos motivos se han implicado en el direccionamiento de las proteínas transmembrana a los lisosomas y a los orgánulos relacionados con los lisosomas.

Ejemplos de señales de tipo YX'X'Z' se proporcionan en la Tabla 8.

Tabla 8 - Señales de tipo YX'X'Z'

Proteína	Especie	Secuencia
LAMP-1	Humana	Tm-RKRSHAGYQTI
LAMP-2a	Humana	Tm-KHHHAGYEQF
LAMP-2a	Pollo	Tm-KKHHNTGYEQF
LAMP-2b	Pollo	Tm-RRKSRTGYQSV
LAMP-2c	Pollo	Tm-RRKSYAGYQTL
LAMP	<i>Drosophila</i>	Tm-RRRSTSRGYMSF
LAMP	Lombriz de tierra	Tm-RKRSRRGYESV
CD63	Humana	Tm-KSIRSGYEVN
GMP-17	Humana	Tm-HCGGPRPGYETL
GMP-17	Ratón	Tm-HCRTRRAEYETL
CD68	Humana	Tm-RRRPSAYQAL
CDIb	Humana	Tm-RRRSYQNIP
CDIc	Humana	Tm-KKHCSYQDIL
CD1d	Ratón	Tm-RRRSAYQDIR
CD1	Rata	Tm-RKRRRSYQDIM
Endolina	Rata	Tm-KFCKSKERNYHTL
Endolina	<i>Drosophila</i>	Tm-KFYKARNERNYHTL
TSC403	Humana	Tm-KIRLRCQSSGYQRI
TSC403	Ratón	Tm-KIRQRHQSSAYQRI

(continuación)

Proteína	Especie	Secuencia
Cistinosina	Humana	Tm-HFCLYRKRPGYDQLN
Portador de solutos putativo	Humana	Tm-12-SLSRGSYKEI
TRP-2	Humana	Tm-RRLRKGYTPLMET-11
HLA-DM	Humana	Tm-RRAGHSSYTPLPGS-9
LmpA	Dictyostelium	Tm-KKLRQQKQQGYQAIINNE
Proteína lisosomal putativa	Dictyostelium	Tm-RSKSNQNSYNLIQL
LIMP-II	Dictyostelium	Tm-RKTFYNNNQYNGYNIIN
Receptor de transferrina	Humana	16-PLSYTRFSLA-35-Tm
Receptor de asialoglicoproteína H1	Humana	MTKEYQDLQHL-29-Tm
CI-MPR	Humana	Tm-22-SYKYSKVNKE-132
CD-MPR	Humana	Tm-40-PAAYRGGVGD-16
CTLA-4	Humana	Tm-10-TGVYVKMPPT-16
Furina	Humana	Tm-17-LISYKGLPPE-29
TGN38	Rata	Tm-23-ASDYQRLNLKL
gp41	HIV-1	Tm-13-RQGYSPLSFQT-144
Fosfatasa ácida	Humana	Tm-RMQAQPPGYRHVADGEDHA

Véase la leyenda de la Tabla 7 para obtener una explicación del formato de señal

Las señales de clasificación basadas en dileucina ([DE]X'X'LL[LI]) juegan papeles decisivos en la clasificación de muchas proteínas transmembrana de tipo I, tipo II y las proteínas transmembranales multipaso. Las señales de clasificación basadas en dileucina están involucradas en la internalización rápida y degradación lisosomal de las proteínas transmembrana y en el direccionamiento de proteínas a los compartimentos endosomales-lisosomales tardíos. Las proteínas transmembrana que contienen formas constitutivamente activas de esta señal se localizan principalmente en los endosomas y lisosomas tardíos.

Ejemplos de señales de clasificación [DE]X'X'LL[LI] se proporcionan en la Tabla 9.

Tabla 9 - Señales de clasificación [DE]X'X'LL[LI]

Proteína	Especie	Señal
CD3-Y	Humana	Tm-8-SDKQTLLPN-26
LIMP-II	Rata	Tm-11-DERAPLIRT
Nmb	Humana	Tm-37-QEKPPLLKN-7
QNR-71	Codorniz	Tm-37-TERNPLLKS-5
Pmel17	Humana	Tm-33-GENSPLLSG-3
Tirosinasa	Humana	Tm-8-EEKQPLLME-12
Tirosinasa	Pez Medaka	Tm--16--GERQPLLQS--13
Tirosinasa	Pollo	Tm-8-PEIQPLLTE-13
TRP-1	Pez dorado	Tm-7-EGRQPLLGD-15
TRP-1	Humana	Tm-7-EANQPLLTD-20
TRP-1	Pollo	Tm-7-ELHQPLLTD-20
TRP-2	Pez cebra	Tm-5-REFEPLLNA-11
VMAT2	Humana	Tm-6-EEKMAILMD-29
VMAT1	Humana	Tm-6-EEKLAILSQ-32
VAchT	Ratón	Tm-10-SERDVLLDE-42
VAMP4	Humana	19-SERRNLLED-88-Tm
FcR neonatal	Rata	Tm-16-DDSGDLLPG-19
CD4	Humana	Tm-12-SQIKRLLSE-17
CD4	Gato	Tm-12-SHIKRLLE-17
GLUT4	Ratón	Tm-17-RRTPSLLEQ-17
GLUT4	Humana	Tm-17-HRTPSLLEQ-17
IRAP	Rata	46-EPRGSRLVLR-53-Tm
li	Humana	MDDQRDLISNNEQLPMLGR-11-Tm
li	Ratón	MDDQRDLISNHEQLPILGN-10-Tm
li	Pollo	MAEEQRDLISSDGSSGVLP-12-Tm
li-1	Pez cebra	MEPDHQNESLIQRVPSAETILGR-12-Tm
li-2	Pez cebra	MSSEGNETPLISDQSSVNMGPQP-8-Tm
Lamp	Trypanosoma	Tm-RPRRRTEEDELPEEAEGIDPQN

(continuación)

Proteína	Especie	Señal
Proteína de Menkes	Humana	Tm-74-PDKHSLLVGDFREDDDTAL
NPC1	Humana	Tm-13-TERERLLNF
AQP4	Humana	Tm-32-VETDDLIL-29
RME-2	<i>C. elegans</i>	Tm-104-FENDSLL
Vam3p	<i>S. cerevisiae</i>	153-NEQSPLLHN-121-Tm
ALP	<i>S. cerevisiae</i>	7-SEQTRLVP-18-Tm
Gap1p	<i>S. cerevisiae</i>	Tm-23-EVQLDLLK-24

Véase la leyenda de la Tabla 7 para obtener una explicación del formato de señal.

Las señales DX'X'LL constituyen un tipo distinto de señales de clasificación basadas en dileucina. Estas señales están presentes en varios receptores transmembrana y otras proteínas que circulan entre la TGN y los endosomas, tales como los CI-MPR y CD-MPR, sortilina, las proteínas relacionadas con el receptor de LDL LRP3 y LRP10, y la β -secretasa.

5

Ejemplos de señales de clasificación DX'X'LL se proporcionan en la Tabla 10.

Tabla 10 - Ejemplos de clasificación DX'X'LL

Proteína	Especie	Secuencia
CI-MPR	Humana	Tm-151-SFHDDSD ED LLHI
CI-MPR	Bovinos	Tm-150-TFHDDSD ED LLHV
CI-MPR	Conejo	Tm-151-SFHDDSD ED LLNI
CI-MPR	Pollo	Tm-148-SFHDDSD ED LLNV
CD-MPR	Humana	Tm-54-EESEERDDHLLPM
CD-MPR	Pollo	Tm-54-DESEERDDHLLPM
Sortilina	Humana	Tm-41-GYHDDSD ED LLE
SorLA	Humana	Tm-41-ITGFSDDVPMVIA
Activador de la cabeza BP	Hydra	Tm-41-INRFS D DEPLVVA
LRP3	Humana	Tm-237-MLEAS D DEALLVC
ST7	Humana	Tm-330-KNETS D DEALLLC
LRP10	Ratón	Tm-235-WVVEAEDEPLLA
LRP10	Humana	Tm-237-WVAEAEDEPLLT
Beta-secretasa	Humana	Tm-9-HDDFADDISLLK
Mucolipina-1	Ratón	Tm-43-GRD S PE D HSLLVN
MHC-I no clásico	Ratón ciervo	Tm-6-VRCHPED R LLG
FLJ30532	Humana	Tm-83-HRVSQ D DL L LLTS
GGA1	Humana	350-ASVSL L D D ELMSL-275
GGA1	Humana	415-ASSGL D DL L LGK-211
GGA2	Humana	408-VQNPS A DRNLLDL-192
GGA3	Humana	384-NALSWLDE L LCL-326
GGA	<i>Drosophila</i>	447-TVDS I DDV P LL S D-116

Véase la leyenda de la Tabla 7 para obtener una explicación del formato de señal. Los restos de serina y treonina están subrayados.

10

Otra familia de motivos de clasificación es proporcionada por grupos de restos ácidos que contienen sitios para fosforilación por CKII. Este tipo de motivo a menudo se encuentra en las proteínas transmembrana que se localizan en la TGN en estado estacionario, incluidas las enzimas procesadoras de prohormonas furina, PC6B, PC7, CPD, y PAM, y la glicoproteína E del herpesvirus 3.

15

Ejemplos de señales de grupos ácidos se proporcionan en la Tabla 11.

Tabla 11 - Señales de clasificación de grupos ácidos

Proteína	Especie	Secuencia
Furina	Ratón	Tm-31-QEECP S D S EEDEG-14
PC6B (1) ^a	Ratón	Tm-39-RDRDYDE D EDDI-36
PC6B (2)	Ratón	Tm-69-LDE I EDDELEYDDES-4
PC7	Humana	Tm-38-KDPDEVE T ES-47
CPD	Humana	Tm-36-HEFQDE T DEET-6

(continuación)

Proteína	Especie	Secuencia
PAM	Humana	Tm-59-QEKEDDGSESEEEY-12
VMAT2	Humana	Tm-35-GEDEESES
VMAT1	Humana	Tm-35-GEDSDEEEDPHEE
VAMP4	Humana	25-LEDDSDDEEEDF-81-Tm
Glicoproteína B	HCMV	Tm-125-KDSDEEENV
Glicoproteína E	Herpesvirus 3	Tm-28-FEDSESTDTIEEF-21
Nef	HIV-1 (AAL65476)	55-LEAQEEEEV-139
Kex1p (1)	<i>S. cerevisiae</i>	Tm-29-ADDLESGLGAEDDLEQDEQLEG-40
Kex1p (2)	<i>S. cerevisiae</i>	Tm-79-TEIDESFEMTDF
Kex2p	<i>S. cerevisiae</i>	Tm-36-TEPEEVEDFDFDLSDDEDH-61
Vps10p	<i>S. cerevisiae</i>	Tm-112-FEIEEDDVPTLEEEH-37

Véase la leyenda de la Tabla 7 para obtener una explicación del formato de señal. Los restos de serina y treonina están subrayados. "El número entre paréntesis es el número de motivo.

5 El receptor KDEL se une a la proteína en el compartimento intermedio ER-Golgi, o en el Golgi temprano y la devuelve al ER. Aunque la señal común de los mamíferos es KDEL, se ha demostrado que el receptor KDEL se une más fuertemente a la secuencia HDEL (Scheel et al; J. Biol. Chem. 268; 7465 (1993)). La señal de retención intracelular puede ser HDEL.

10 Las señales KKK'X' y KX'KX'X' son señales de recuperación que se pueden colocar en el lado citoplasmático de una proteína de membrana tipo I. Los requisitos de secuencia de estas señales se proporcionan en detalle por Teasdale & Jackson (Annu. Rev. Cell Dev. Biol.; 12; 27 (1996)).

La señal de retención intracelular puede seleccionarse del grupo de: NPX'Y, YX'X'Z, [DE]X'X'X'L[LI], DX'X'LL, DP[FW], FX'DX'F, NPF, LZ'X'Z[DE], LLDLL, PWDLLW, KDEL, HDEL, KKK'X' o KX'KX'X'; en la que X' es cualquier aminoácido y Z' es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba voluminosa.

15 La señal de retención intracelular puede ser cualquier secuencia mostrada en las Tablas 7 a 11.

La señal de retención intracelular puede comprender la señal de retención intracelular proteína relacionada con tirosinasa (TYRP)-1. La señal de retención intracelular puede comprender el dominio intracelular TYRP-1. La señal de retención intracelular puede comprender la secuencia NQPLLED (SEQ ID NO: 1).

20 TYRP1 es una proteína melanosomal bien caracterizada que se retiene en el melanosoma (un lisosoma especializado) con una eficacia >99 %. TYRP1 es una proteína transmembrana de 537 aminoácidos con un dominio luminal (1-477aa), un dominio transmembrana (478-501) y un dominio citoplasmático (502-537). Una señal de di-leucina que reside en el dominio citoplasmático provoca la retención de la proteína. Esta señal de di-leucina tiene la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1 (NQPLLED).

30 La señal de retención intracelular puede estar en el endodominio del CAR. En otras palabras, la señal de retención intracelular puede estar en el dominio de la proteína transmembrana que estaría en el lado intracelular de la membrana celular si la proteína se expresara correctamente en la superficie celular.

35 La señal de retención intracelular puede ser proximal al dominio transmembrana, por ejemplo, puede estar inmediatamente conectado a él. La señal de retención intracelular puede ser distal al dominio transmembrana, por ejemplo, en el terminal carboxilo del endodominio. El posicionamiento de la señal de retención modula su actividad permitiendo "sintonizar" la expresión relativa de dos proteínas. Por ejemplo, en el caso del motivo TYRP1 di-leucina, la colocación proximal da como resultado una expresión superficial de bajo nivel, mientras que la colocación distal da como resultado una expresión superficial intermedia, como se muestra en los Ejemplos.

POLIPÉPTIDO DE INTERÉS

40 Cualquiera o todos de A o B; o A, B o C de las secuencias de ácido nucleico en las construcciones definidas en la presente memoria pueden codificar un CAR que puede comprender o no una señal de retención intracelular y/o un péptido de señal alterado.

45 La construcción de ácido nucleico puede comprender una o más secuencias de ácido nucleico adicionales que codifican polipéptidos de interés (POI). Por ejemplo, los POI pueden ser una proteína intracelular tal como una proteína nucleica, una proteína citoplasmática o una proteína localizada en un compartimento unido a la membrana; una

proteína secretora o una proteína transmembrana.

El POI puede ser un gen suicida y/o un gen marcador.

5 GEN SUICIDA/MARCADOR

Un gen suicida es un gen que codifica un polipéptido que, cuando se expresa por una célula, permite que esa célula se elimine.

10 Un gen marcador es un gen que codifica un polipéptido que permite la selección de una célula que expresa ese polipéptido.

En la técnica se conocen varios genes suicidas y marcadores. El documento WO2013/153391 describe un polipéptido compacto que comprende tanto un resto marcador como un resto suicida. El polipéptido puede coexpresarse con un transgén terapéutico, tal como un gen que codifica un CAR.

15 El resto marcador comprende un epítipo mínimo de CD34 que permite la selección eficaz de células transducidas usando, por ejemplo, el sistema CD34 cliniMACS de Miltenyi.

20 El resto suicida comprende un epítipo mínimo basado en el epítipo de CD20. Las células que expresan un polipéptido que comprende esta secuencia pueden destruirse selectivamente usando un anticuerpo lítico tal como Rituximab.

La combinación de marcador y polipéptido suicida se expresa de manera estable en la superficie celular después, por ejemplo, de la transducción retroviral de su secuencia codificante.

25 El polipéptido marcador/suicida puede tener la fórmula:
St-R1-S1-Q-S2-R2 en la que

30 St es una secuencia de pedúnculo que, cuando el polipéptido se expresa en la superficie de una célula diana, hace que los epítopos R y Q se proyecten desde la superficie celular;
R1 y R2 son epítopos de unión a rituximab;
S1 y S2 son secuencias espaciadoras opcionales, que pueden ser iguales o diferentes; y
Q es un epítipo de unión a QBEnd10.

35 El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 17, o una variante de la misma que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 17 y que (i) se une a QBEND10; (ii) se une a Rituximab y (iii) cuando se expresa en la superficie de una célula, induce la destrucción mediada por el complemento de la célula en presencia de Rituximab.

40 CPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFNSVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLCSGGGGSPAPRPP
TPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHR
NRRRVCKCPRPVV (SEQ ID NO: 17)

45 En la presente memoria se describe un método para eliminar una célula que expresa dicho gen marcador/suicida, que comprende la etapa de exponer las células a rituximab.

CÉLULA

50 La presente invención se refiere a una célula que coexpresa un primer CAR y un segundo CAR en la superficie celular. La célula expresa una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

La célula puede ser cualquier célula eucariota capaz de expresar un CAR en la superficie celular, tal como una célula inmunológica.

55 En particular, la célula puede ser una célula inmunitaria efectora tal como un linfocito T o un linfocito citolítico natural (NK).

60 Las células T o los linfocitos T son un tipo de linfocitos que juegan 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 varios tipos de linfocitos T, tal como se resume a continuación.

65 Los linfocitos T colaboradores (linfocitos TH) ayudan a otros glóbulos blancos 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, incluyendo TH1, TH2, TH3, TH17, Th9 o TFH, que secretan diferentes citocinas para facilitar diferentes tipos de respuestas inmunitarias.

5 Los linfocitos T citotóxicos (linfocitos TC o CTL) destruyen las células infectadas por virus y las células tumorales, y también están implicadas en el rechazo de trasplantes. Los CTL expresan el CD8 en su superficie. Estas células reconocen sus dianas al unirse al antígeno asociado con 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 a un gran número de linfocitos T efectores tras la reexposición a su antígeno relacionado, proporcionando así al sistema inmune "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 efectores de memoria (linfocitos TEM y linfocitos TEMRA). Los linfocitos de memoria pueden ser CD4+ o CD8+. Los linfocitos T de memoria típicamente expresan la proteína de la superficie celular CD45RO.

Los linfocitos T reguladores (linfocitos Treg), anteriormente conocido 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 naturales 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 con células dendríticas mieloides (CD11c+) y plasmacitoides (CD123+) que se han activado con TSLP. Los linfocitos Treg de origen natural se pueden distinguir de 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, causando la enfermedad autoinmunitaria letal IPEX.
30

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

El linfocito T de la invención puede ser cualquiera de los tipos de linfocitos T mencionados anteriormente, en particular un CTL.

Los linfocitos citolíticos naturales (NK) son un tipo de célula citolítica que forma 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 (LGL) 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, bazo, las amígdalas y el timo donde luego entran en la circulación.
45

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

50 Las células que expresan CAR, tales como los linfocitos T o NK que expresan CAR pueden ser creadas *ex vivo* ya sea de la propia sangre periférica del paciente (1ª parte), o en el contexto de un trasplante de células madre hematopoyéticas de sangre periférica del donante (2ª parte), o de sangre periférica de un donante no relacionado (3ª parte).

55 La presente invención también proporciona una composición celular que comprende células que expresan CAR, tales como linfocitos T y/o NK que expresan CAR, de acuerdo con la presente invención. La composición celular puede hacerse transduciendo una muestra de sangre *ex vivo* con una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

60 Como alternativa, las células que expresan CAR pueden derivarse de la diferenciación *ex vivo* de células progenitoras inducibles o células progenitoras embrionarias al tipo de célula relevante, tales como linfocitos T. Como alternativa, se puede usar una línea celular inmortalizada tal como una línea de linfocitos T que conserva su función lítica y podría actuar como un agente terapéutico.

65 En todas estas realizaciones, las células con CAR se generan mediante la introducción de ADN o ARN que codifica los CAR por uno de los muchos medios, incluida la transducción con un vector viral, la transfección con ADN o ARN.

Un linfocito T con CAR de la invención puede ser un linfocito T *ex vivo* de un sujeto. El linfocito T puede ser de una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Los linfocitos T pueden activarse y/o expandirse antes de ser transducidos con ácido nucleico que codifica CAR, por ejemplo mediante tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-CD3.

Un linfocito T con CAR de la invención puede hacerse mediante:

- (i) aislamiento de una muestra que contiene linfocitos T de un sujeto u otras fuentes enumeradas anteriormente; y
- (ii) transducción o transfección de los linfocitos T con una construcción de ácido nucleico que codifica el primer y el segundo CAR.

Después, los linfocitos T pueden purificarse, por ejemplo, seleccionarse en base de la co-expresión del primer y segundo CAR. VECTOR

La presente invención también proporciona un vector que comprende una construcción de ácido nucleico que codifica CAR como se define en la presente memoria. Tal vector se puede usar para introducir la secuencia o secuencias de ácido nucleico en una célula hospedadora para que exprese el primer y el segundo CAR.

El vector puede, por ejemplo, ser un plásmido o un vector viral, tal como un vector retroviral o un vector lentiviral, o un vector basado en transposón o ARNm sintético.

El vector puede tener la capacidad de transfectar o transducir un linfocito T.

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene una pluralidad de células que expresan CAR, tal como linfocitos T o linfocitos NK, de la invención. 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.

MÉTODO DE TRATAMIENTO

Las células de la presente invención pueden ser capaces de eliminar células diana, tales como las células cancerosas. La célula diana puede ser reconocible por un patrón definido de expresión de antígeno, por ejemplo, la expresión de antígeno A Y antígeno B.

Las células de la presente invención pueden usarse para el tratamiento de una infección, tal como una infección viral.

Las células de la invención también pueden usarse para el control de respuestas inmunitarias patógenas, por ejemplo en enfermedades autoinmunitarias, alergias y rechazo de injerto contra huésped.

Las células de la invención se pueden usar para el tratamiento de 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 de Hodgkin, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de tiroides.

Es particularmente adecuado para el tratamiento de tumores sólidos donde la disponibilidad de buenas dianas individuales selectivas es limitada.

Las células de la invención pueden usarse para tratar: cánceres de la cavidad oral y la faringe, que incluyen cáncer de lengua, boca y faringe; cánceres del sistema digestivo que incluye cánceres esofágicos, gástricos y colorrectales; cánceres del hígado y del árbol biliar que incluye carcinomas hepatocelulares y colangiocarcinomas; cánceres del sistema respiratorio que incluye cánceres broncogénicos y cánceres de laringe; cánceres de huesos y articulaciones que incluyen osteosarcoma; cánceres de piel que incluyen melanoma; cáncer de mama; cánceres del tracto genital que incluyen cáncer uterino, de ovario y cervical en mujeres, cáncer de próstata y testicular en hombres; cánceres del tracto renal que incluyen carcinoma de células renales y carcinomas de células de transición de uréter o vejiga; cánceres cerebrales que incluyen gliomas, glioblastoma multiforme y meduloblastomas; cánceres del sistema endocrino que incluyen cáncer de tiroides, carcinoma suprarrenal y cánceres asociados con síndromes de neoplasias endocrinas múltiples; linfomas que incluyen linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin; mieloma múltiple y plasmocitomas; leucemias agudas y crónicas, mieloides o linfoides; y cánceres de otros sitios no especificados, incluido el neuroblastoma.

El tratamiento con las células de la invención puede ayudar a prevenir el escape o la liberación de células tumorales que a menudo ocurre con estrategias convencionales.

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 que de ninguna manera pretenden limitar el alcance de la invención.

5 **Ejemplos**

Ejemplo 1 - Creación de poblaciones de células diana

10 Con el fin de probar el principio de la invención, se eligieron arbitrariamente receptores basados en anti-CD19 y anti-CD33. Usando vectores retrovirales, se clonaron CD19 y CD33. Estas proteínas se truncaron para que no emitan señales y puedan expresarse de manera estable durante períodos prolongados. A continuación, estos vectores se usaron para transducir la línea celular SupT1 de forma individual o doble para establecer células negativas para ambos antígenos (el tipo silvestre), positivas para uno y positivas para ambos. Los datos de expresión se muestran en la Figura 3.

15 Ejemplo 2 - Diseño y función de la puerta Y

20 La puerta Y combina un receptor activador simple con un receptor que inhibe básicamente la actividad, pero cuya inhibición se desactiva una vez que se liga el receptor. Esto se logró combinando un CAR de 1ª generación convencional con un espaciador de pedúnculo de CD8 corto/no voluminoso y un endodominio de CD3 Zeta con un segundo receptor con un espaciador Fc voluminoso cuyo endodominio contenía endodominios CD148 o CD45. Cuando ambos receptores están ligados, la diferencia en las dimensiones del espaciador da como resultado el aislamiento de los diferentes receptores en diferentes compartimientos de membrana, liberando al receptor CD3 Zeta de la inhibición por los endodominios de CD148 o CD45. De esta manera, la activación solo se produce una vez que los receptores se han activado. Se eligieron para esto CD148 y CD45, ya que funcionan de esta forma en estado natural: por ejemplo, el ectodominio de CD45 muy voluminoso excluye a todo el receptor de la sinapsis inmunológica. El casete de expresión se representa en la Figura 4 y las consiguientes proteínas en la Figura 5.

30 La tinción de la superficie para la diferente especificidad mostró que ambos pares de receptores podrían expresarse efectivamente en la superficie celular que se muestra en la Figura 6. La función en BW5147 muestra que el linfocito T solo se activa en presencia de ambos antígenos (Figura 7).

Ejemplo 3: Demostración de la posibilidad de generalizar la puerta Y

35 Para asegurarse de que las observaciones no fueran una manifestación de alguna característica específica de CD19/CD33 y los ligantes que se habían utilizado, se intercambiaron los dos scFvs de direccionamiento de tal manera que ahora, la señal de activación (ITAM) se transmitía al reconocer CD33, en lugar de CD19; y la señal inhibitoria (CD148) se transmitía al reconocer CD19, en lugar de CD33. Dado que los endodominios de CD45 y CD148 se consideran funcionalmente similares, la experimentación se restringió a las puertas Y con el endodominio de CD148. Esto debería dar como resultado todavía una puerta Y funcional. Los linfocitos T que expresan la nueva puerta lógica fueron estimulados con dianas que portaban solo CD19 o CD33, o ambos. Los linfocitos T respondieron a dianas que expresaban tanto CD19 como CD33, pero no a dianas que expresaban solo uno o ninguno de estos antígenos. Esto muestra que la puerta Y todavía funciona en este formato (Figura 8B).

45 En las mismas líneas se buscó establecer en qué medida era generalizable nuestra puerta Y: la puerta Y debería ser generalizable con diferentes dianas. Si bien puede haber una fidelidad menor o mayor de la puerta dada la densidad relativa de antígeno, la cinética de unión de scFv afin y la distancia precisa del epítipo de unión de scFv, cabría esperar ver algunas manifestaciones de puerta Y con un amplio conjunto de dianas y ligantes. Para someter a ensayo esto, se generaron tres puertas Y adicionales. Una vez más, la experimentación se restringió a la versión CD148 de la puerta Y. El segundo scFv de la puerta Y CD148 original se reemplazó con el anti-GD2 scFv huK666, o con el anti-CD5 scFv, o el anti-EGFRvIII scFv MR1.1 para generar las siguientes puertas Y CAR: CD19 Y GD2; CD19 Y CD5; CD19 Y EGFRvIII. También se generaron las siguientes líneas celulares que expresan antígeno artificial: transduciendo SupT1 y nuestro SupT1.CD19 con las GM3 y GD2 sintetas se generaron SupT1.GD2 y SupT1.CD19.GD2. Transduciendo SupT1 y SupT1.CD19 con un vector retroviral que codifica EGFRvIII se generaron SupT1.EGFRvIII y SupT1.CD19.EGFRvIII. Dado que CD5 se expresa en las células SupT1, se utilizó una línea celular diferente para generar las células diana: se generaron células 293T que expresan CD19 solo, CD5 solo y CD5 y CD19 juntos. La expresión se confirmó por citometría de flujo (Figura 9). Los linfocitos T que expresan las tres nuevas puertas CAR Y se estimularon con SupT1.CD19 y las respectivas células diana doble positivo y simple positivo afines. Las tres puertas Y demostraron una activación reducida por las líneas celulares doble positivo en comparación con las dianas simple positivo (Figura 10). Esto demuestra la posibilidad de generalizar el diseño de la puerta Y a dianas arbitrarias y ligantes afines.

Ejemplo 4: Prueba experimental del modelo de segregación cinética de la puerta Y de CAR

65 El objetivo era demostrar que el modelo de segregación diferencial causada por diferentes espaciadores es el mecanismo central que se esconde detrás de la capacidad de generar estas puertas lógicas de CAR. El modelo es

que si solo el CAR activador está ligado, el potente CAR inhibidor en "ausencia de ligadura" está en solución en la membrana y puede inhibir el CAR activador. Una vez que ambos CAR están ligados, si ambos espaciadores CAR son lo suficientemente diferentes, se segregarán dentro de la sinapsis y no se ubicarán conjuntamente. Por lo tanto, un requisito clave es que los espaciadores sean lo suficientemente diferentes. Si el modelo es correcto, si ambos espaciadores son suficientemente similares para que se coloquen cuando ambos receptores están ligados, la puerta no funcionará. Para someter a ensayo esto, el espaciador Fc "voluminoso" en el CAR original se reemplazó con un espaciador CD8 murino. Se predijo que este tiene la longitud, volumen y carga similares a la CD8 humana, por lo que no debería emparejarse. Por lo tanto, la nueva puerta tenía un primer CAR que reconoce CD19, un espaciador en el pedúnculo de CD8 y un endodominio de activación; mientras que el segundo CAR reconoce CD33, tiene un espaciador de pedúnculo de CD8 de ratón y un endodominio de CD148 (Figura 8C). Los linfocitos T se transdujeron para expresar esta nueva puerta de CAR. Estos linfocitos T fueron después estimulados con células SupT1 que expresan CD19 solo, CD33 solo o CD19 y CD33 juntos. Los linfocitos T no respondieron a las células SupT1 que expresaban cualquiera de los antígenos solos según la puerta Y original. Sin embargo, los linfocitos T con CAR no respondieron a las células SupT1 que expresaban ambos antígenos, confirmando así el modelo (Figura 8C). Una puerta Y funcional requiere que ambos CAR tengan espaciadores suficientemente diferentes para que no se coloquen dentro de una sinapsis inmunológica (Figura 11A y B).

Ejemplo 5: Análisis funcional de la puerta Y en células primarias

Se aislaron PBMC de la sangre y se estimularon usando PHA e IL-2. Dos días más tarde las células fueron transducidas en placas recubiertas con retronectina con retrovirus que contienen la construcción con la puerta Y CD19:CD33. El día 5, el nivel de expresión de los dos CAR traducidos por la construcción de la puerta Y se evaluó mediante citometría de flujo y se agotaron los linfocitos CD56+ (predominantemente los linfocitos NK). El día 6 las PBMC se colocaron en un co-cultivo con células diana en una relación efector:célula diana de 1:2. El día 8 el sobrenadante se recogió y se analizó mediante ELISA para determinar la secreción de IFN-gamma (Figura 12).

Estos datos demuestran que la puerta Y funciona en células primarias.

Ejemplo 6 - Análisis de las señales de retención lisosomal de TYRP1

La capacidad de la señal de retención de la proteína relacionada con la tirosinasa 1 (TYRP1) para provocar la retención de un polipéptido cuando se encuentra en el contexto de un endodominio más complejo se determinó usando varias construcciones (Figura 16). La construcción de tipo silvestre se comparó con las construcciones en las que se añadió proteína verde fluorescente mejorada (eGFP) o se reemplazó el endodominio de TYRP1. Cuando se agregó eGFP, se colocó después o antes del endodominio nativo, por lo que la señal de retención estaba en su ubicación nativa (justo debajo de la membrana) o distal a ella.

Todas las construcciones se co-expresan con IRES.CD34. La tinción de células SupT1 transducidas se muestra con tinción intracelular y superficial en la Figura 16.

Se encontró que el reemplazo del endodominio dio como resultado una expresión de superficie muy brillante, la introducción de eGFP después de la señal de retención casi no produjo expresión de superficie y la introducción antes de la señal de retención dio lugar a una expresión de superficie intermedia (Figura 16).

Ejemplo 7 - Modulación de la expresión relativa de una proteína transmembrana coexpresada a partir de un casete de expresión único con una proteína separada

Se modificó un casete de expresión que codifica dos proteínas transmembrana CAR para que una de las proteínas CAR tuviera la señal de retención lisosomal de TYRP1 introducida proximal o distal a la membrana. La expresión de cada una de estas dos nuevas variantes en la superficie celular se comparó con la de la proteína CAR original no modificada.

Se aislaron PBMC de la sangre y se estimularon usando PHA e IL-2. Dos días más tarde las células fueron transducidas en placas recubiertas con retronectina con retrovirus que contienen la construcción de CAR CD19:CD33. El día 5, el nivel de expresión de los dos CAR traducidos por la construcción se evaluó mediante citometría de flujo y se agotaron los linfocitos CD56+ (predominantemente los linfocitos NK). El día 6 las PBMC se colocaron en un co-cultivo con células diana en una relación efector:célula diana de 1:2. El día 8 el sobrenadante se recogió y se analizó mediante ELISA para determinar la secreción de IFN-gamma.

El patrón observado con las fusiones Tyrp1-eGFP fue de cierta reducción de la expresión de la proteína transmembrana modificada con la señal de retención distal y una reducción marcada en el caso de la señal de retención proximal. Como cabía esperar, la expresión de la segunda proteína transmembrana del casete no se alteró (Figura 17).

Ejemplo 8 - Modulación de la expresión usando una señal de retención de la proteína E3/19K adenoviral

La proteína E3/19K del adenovirus humano es una glucoproteína transmembrana tipo I del retículo endoplásmico/Golgi que anula el transporte de la superficie celular del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y las moléculas de las cadenas A y B relacionadas con el MHC-I (MICA/B). Se identificó que el motivo de retención dependía de la cola citosólica de la proteína E3/19K de adenovirus. De manera más específica, se encontró que los últimos 6aa DEKKMP eran los más importantes para la retención. Se encontró que el posicionamiento óptimo era en el extremo c de la proteína.

Se modificó un casete de expresión que codifica dos proteínas transmembrana CAR, tal como se describe en el Ejemplo 7, de modo que una de las proteínas CAR tenía el motivo de retención de la proteína E3/19K de adenovirus. En este experimento, el motivo de retención en el segundo CAR en el casete de expresión (el CAR inhibidor anti-CD33).

Se generaron construcciones que comprenden la cola citosólica completa de la proteína E3/19K de adenovirus o solo los últimos 6aa de E3/19K (DEKKMP), que se vio que eran decisivos para su capacidad de retención en el aparato de Golgi/ER (Figura 18). Estas construcciones se transfectaron en células 293T y se tiñeron principalmente con una proteína CD19-Fc de conejo soluble quimérica y una proteína CD33-Fc de ratón. Posteriormente, estas células se tiñeron con un anti-Fc-FITC de conejo y un anti-Fc-APC de ratón (Figura 19). Estas células muestran una retención clara cuando la proteína E3/19K de adenovirus de longitud completa, o el motivo DEKKMP, se colocaba en el receptor anti-CD33 pero no tuvo efecto sobre los niveles de expresión del receptor anti-CD19.

Ejemplo 9 - Modulación de la expresión alterando el péptido de señal - intercambio de la secuencia de señal V-III de la cadena kappa de la Ig murina

El documento PCT/GB2014/053452 describe un sistema de vector que codifica dos receptores de antígeno quiméricos (CAR), uno contra CD19 y uno contra CD33. El péptido de señal utilizado para los CAR en ese estudio fue el péptido de señal de la secuencia de señal de CD8a humana. Para los fines del estudio, esta se sustituyó con el péptido de señal de la región V-III de la cadena kappa de la Ig murina, que tiene la secuencia: METDTLILWVLLLLVPGSTG (los restos hidrófobos están destacados en negrita). Con el fin de establecer que la secuencia de señal de la región V-III de la cadena kappa de la Ig murina funcionaba también como la secuencia de señal de la CD8a humana, se llevó a cabo un estudio comparativo. Para ambas secuencias de señal, se observó la expresión funcional del CAR anti-CD33 y del CAR anti-CD19. Esta secuencia de señal sustituida y todas las mutaciones posteriores de la misma se transfectaron transitoriamente en células 293T. Tres días después de la transfección, las células 293T se tiñeron tanto con CD19 quimérica soluble fusionada con la cadena Fc de conejo como con CD33 quimérica soluble fusionada con la cadena Fc de ratón. Todas las células se tiñeron a continuación con anti-Fc-FITC de conejo y anti-Fc-APC de ratón. Los gráficos de citometría de flujo muestran la secuencia de señal sustituida como una comparación con no transfectado (NT) y la construcción con secuencias de señal de Cd8 (Figura 22). Se encontró que la secuencia señal de V-III de la cadena kappa de la Ig murina funcionaba tan bien como la secuencia de señal de CD8a humana.

Ejemplo 10 - Alteración de la expresión relativa eliminando restos hidrófobos en el péptido de señal.

Los restos hidrófobos se eliminaron paso a paso y se observó el efecto sobre la expresión relativa del CAR anti-CD33 y el CAR anti-CD19. Se investigó el efecto de una, dos, tres y cuatro deleciones de aminoácidos y los resultados se muestran en las Figuras 23 a 26 respectivamente.

Todas las construcciones mutantes mostraron una disminución en la expresión relativa del CAR anti-CD19 en comparación con el CAR anti-CD33. La disminución relativa de la expresión del CAR anti-CD19 fue mayor con un mayor número de deleciones de aminoácidos de 1 a 3, pero luego se estabilizó (cuatro deleciones dieron una disminución similar en la expresión que tres deleciones). Aunque la presente invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención según se reivindica no debe considerarse limitada indebidamente a dichas realizaciones específicas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UCL Business PLC

<120> CONSTRUCCIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO

<130> P106292PCT

<150> GB1507115.2

<151> 27/04/2015

<160> 239

<170> PatentIn versión 3.5

ES 2 777 801 T3

5 <210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Señal de retención intracelular de la proteína relacionada con la tirosinasa (TYRP)-1

10 <400> 1

Asn Gln Pro Leu Leu Thr Asp
1 5

15 <210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Señal de retención intracelular de E3/19K adenoviral

20 <400> 2

Lys Tyr Lys Ser Arg Arg Ser Phe Ile Asp Glu Lys Lys Met Pro
1 5 10 15

25 <210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Señal de retención intracelular de E3/19K adenoviral

<400> 3

Asp Glu Lys Lys Met Pro
1 5

35 <210> 4
<211> 1350
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La puerta Y de CAR que reconoce CD19 Y CD33 usando una fosfatasa de CD148

45 <400> 4

ES 2 777 801 T3

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 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
50 55 60

Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
115 120 125

Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
145 150 155 160

Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly
165 170 175

Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg
180 185 190

Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr
195 200 205

Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser
210 215 220

Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr

ES 2 777 801 T3

225					230						235					240
Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	
				245						250					255	
Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Asp	Pro	
			260					265						270		
Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	
			275					280					285			
Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	
	290					295					300					
Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Phe	Trp	
305					310					315					320	
Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	
				325					330						335	
Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	
			340					345					350			
Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	
		355					360					365				
Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	
	370					375					380					
Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	
385					390					395					400	
Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	
				405					410						415	
Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	
			420					425					430			
Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	
		435					440					445				
Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly	
	450					455					460					
Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Ala	
465					470					475					480	

ES 2 777 801 T3

Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala
 485 490 495

Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 500 505 510

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr
 515 520 525

Phe Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 530 535 540

Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe
 545 550 555 560

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 565 570 575

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Lys Asn Tyr
 580 585 590

Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Gly
 595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 610 615 620

Gly Gly Ser Arg Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 625 630 635 640

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 645 650 655

Thr Leu Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 660 665 670

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Leu Asn Gly Gly Ser Thr Tyr
 675 680 685

Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 690 695 700

Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 705 710 715 720

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gln Asp Ala Tyr Thr Gly Gly Tyr Phe
 725 730 735

ES 2 777 801 T3

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Met Asp Pro
 740 745 750

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 755 760 765

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 770 775 780

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 785 790 795 800

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 805 810 815

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 820 825 830

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 835 840 845

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 850 855 860

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 865 870 875 880

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 885 890 895

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 900 905 910

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 915 920 925

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 930 935 940

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 945 950 955 960

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 965 970 975

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Ala Val Phe Gly
 980 985 990

ES 2 777 801 T3

Cys Ile Phe Gly Ala Leu Val Ile Val Thr Val Gly Gly Phe Ile Phe
995 1000 1005

Trp Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ala Lys Asn Asn Glu Val Ser Phe
1010 1015 1020

Ser Gln Ile Lys Pro Lys Lys Ser Lys Leu Ile Arg Val Glu Asn
1025 1030 1035

Phe Glu Ala Tyr Phe Lys Lys Gln Gln Ala Asp Ser Asn Cys Gly
1040 1045 1050

Phe Ala Glu Glu Tyr Glu Asp Leu Lys Leu Val Gly Ile Ser Gln
1055 1060 1065

Pro Lys Tyr Ala Ala Glu Leu Ala Glu Asn Arg Gly Lys Asn Arg
1070 1075 1080

Tyr Asn Asn Val Leu Pro Tyr Asp Ile Ser Arg Val Lys Leu Ser
1085 1090 1095

Val Gln Thr His Ser Thr Asp Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Met
1100 1105 1110

Pro Gly Tyr His Ser Lys Lys Asp Phe Ile Ala Thr Gln Gly Pro
1115 1120 1125

Leu Pro Asn Thr Leu Lys Asp Phe Trp Arg Met Val Trp Glu Lys
1130 1135 1140

Asn Val Tyr Ala Ile Ile Met Leu Thr Lys Cys Val Glu Gln Gly
1145 1150 1155

Arg Thr Lys Cys Glu Glu Tyr Trp Pro Ser Lys Gln Ala Gln Asp
1160 1165 1170

Tyr Gly Asp Ile Thr Val Ala Met Thr Ser Glu Ile Val Leu Pro
1175 1180 1185

Glu Trp Thr Ile Arg Asp Phe Thr Val Lys Asn Ile Gln Thr Ser
1190 1195 1200

Glu Ser His Pro Leu Arg Gln Phe His Phe Thr Ser Trp Pro Asp
1205 1210 1215

His Gly Val Pro Asp Thr Thr Asp Leu Leu Ile Asn Phe Arg Tyr

ES 2 777 801 T3

1220 1225 1230

Leu Val Arg Asp Tyr Met Lys Gln Ser Pro Pro Glu Ser Pro Ile
1235 1240 1245

Leu Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Thr Phe Ile
1250 1255 1260

Ala Ile Asp Arg Leu Ile Tyr Gln Ile Glu Asn Glu Asn Thr Val
1265 1270 1275

Asp Val Tyr Gly Ile Val Tyr Asp Leu Arg Met His Arg Pro Leu
1280 1285 1290

Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Val Phe Leu Asn Gln Cys Val
1295 1300 1305

Leu Asp Ile Val Arg Ser Gln Lys Asp Ser Lys Val Asp Leu Ile
1310 1315 1320

Tyr Gln Asn Thr Thr Ala Met Thr Ile Tyr Glu Asn Leu Ala Pro
1325 1330 1335

Val Thr Thr Phe Gly Lys Thr Asn Gly Tyr Ile Ala
1340 1345 1350

<210> 5
<211> 1717
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> La PUERTA Y de CAR que reconoce CD19 Y CD33 usando una fosfatasa de CD45

10

<400> 5

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 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
50 55 60

Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro

ES 2 777 801 T3

Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val
 325 330 335

Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Arg Val Lys Phe Ser Arg
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Ala Glu Gly Arg Gly
 450 455 460

Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala
 465 470 475 480

Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala
 485 490 495

Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 500 505 510

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr
 515 520 525

Phe Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 530 535 540

Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe
 545 550 555 560

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 565 570 575

ES 2 777 801 T3

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Lys Asn Tyr
580 585 590

Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Gly
595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
610 615 620

Gly Gly Ser Arg Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
625 630 635 640

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
645 650 655

Thr Leu Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys
660 665 670

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Leu Asn Gly Gly Ser Thr Tyr
675 680 685

Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
690 695 700

Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
705 710 715 720

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gln Asp Ala Tyr Thr Gly Gly Tyr Phe
725 730 735

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Met Asp Pro
740 745 750

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
755 760 765

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
770 775 780

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
785 790 795 800

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
805 810 815

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
820 825 830

ES 2 777 801 T3

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 835 840 845
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 850 855 860
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 865 870 875 880
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 885 890 895
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 900 905 910
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 915 920 925
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 930 935 940
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 945 950 955 960
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 965 970 975
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Ala Leu Ile Ala
 980 985 990
 Phe Leu Ala Phe Leu Ile Ile Val Thr Ser Ile Ala Leu Leu Val Val
 995 1000 1005
 Leu Tyr Lys Ile Tyr Asp Leu His Lys Lys Arg Ser Cys Asn Leu
 1010 1015 1020
 Asp Glu Gln Gln Glu Leu Val Glu Arg Asp Asp Glu Lys Gln Leu
 1025 1030 1035
 Met Asn Val Glu Pro Ile His Ala Asp Ile Leu Leu Glu Thr Tyr
 1040 1045 1050
 Lys Arg Lys Ile Ala Asp Glu Gly Arg Leu Phe Leu Ala Glu Phe
 1055 1060 1065
 Gln Ser Ile Pro Arg Val Phe Ser Lys Phe Pro Ile Lys Glu Ala

ES 2 777 801 T3

1070						1075						1080			
Arg Lys	Pro Phe	Asn Gln	Asn Lys	Asn Arg	Tyr Val	Asp Ile	Leu								
1085			1090			1095									
Pro Tyr	Asp Tyr	Asn Arg	Val Glu	Leu Ser	Glu Ile	Asn Gly	Asp								
1100			1105			1110									
Ala Gly	Ser Asn	Tyr Ile	Asn Ala	Ser Tyr	Ile Asp	Gly Phe	Lys								
1115			1120			1125									
Glu Pro	Arg Lys	Tyr Ile	Ala Ala	Gln Gly	Pro Arg	Asp Glu	Thr								
1130			1135			1140									
Val Asp	Asp Phe	Trp Arg	Met Ile	Trp Glu	Gln Lys	Ala Thr	Val								
1145			1150			1155									
Ile Val	Met Val	Thr Arg	Cys Glu	Glu Gly	Asn Arg	Asn Lys	Cys								
1160			1165			1170									
Ala Glu	Tyr Trp	Pro Ser	Met Glu	Glu Gly	Thr Arg	Ala Phe	Gly								
1175			1180			1185									
Asp Val	Val Val	Lys Ile	Asn Gln	His Lys	Arg Cys	Pro Asp	Tyr								
1190			1195			1200									
Ile Ile	Gln Lys	Leu Asn	Ile Val	Asn Lys	Lys Glu	Lys Ala	Thr								
1205			1210			1215									
Gly Arg	Glu Val	Thr His	Ile Gln	Phe Thr	Ser Trp	Pro Asp	His								
1220			1225			1230									
Gly Val	Pro Glu	Asp Pro	His Leu	Leu Leu	Lys Leu	Arg Arg	Arg								
1235			1240			1245									
Val Asn	Ala Phe	Ser Asn	Phe Phe	Ser Gly	Pro Ile	Val Val	His								
1250			1255			1260									
Cys Ser	Ala Gly	Val Gly	Arg Thr	Gly Thr	Tyr Ile	Gly Ile	Asp								
1265			1270			1275									
Ala Met	Leu Glu	Gly Leu	Glu Ala	Glu Asn	Lys Val	Asp Val	Tyr								
1280			1285			1290									
Gly Tyr	Val Val	Lys Leu	Arg Arg	Gln Arg	Cys Leu	Met Val	Gln								
1295			1300			1305									

ES 2 777 801 T3

Val Glu Ala Gln Tyr Ile Leu Ile His Gln Ala Leu Val Glu Tyr
1310 1315 1320

Asn Gln Phe Gly Glu Thr Glu Val Asn Leu Ser Glu Leu His Pro
1325 1330 1335

Tyr Leu His Asn Met Lys Lys Arg Asp Pro Pro Ser Glu Pro Ser
1340 1345 1350

Pro Leu Glu Ala Glu Phe Gln Arg Leu Pro Ser Tyr Arg Ser Trp
1355 1360 1365

Arg Thr Gln His Ile Gly Asn Gln Glu Glu Asn Lys Ser Lys Asn
1370 1375 1380

Arg Asn Ser Asn Val Ile Pro Tyr Asp Tyr Asn Arg Val Pro Leu
1385 1390 1395

Lys His Glu Leu Glu Met Ser Lys Glu Ser Glu His Asp Ser Asp
1400 1405 1410

Glu Ser Ser Asp Asp Asp Ser Asp Ser Glu Glu Pro Ser Lys Tyr
1415 1420 1425

Ile Asn Ala Ser Phe Ile Met Ser Tyr Trp Lys Pro Glu Val Met
1430 1435 1440

Ile Ala Ala Gln Gly Pro Leu Lys Glu Thr Ile Gly Asp Phe Trp
1445 1450 1455

Gln Met Ile Phe Gln Arg Lys Val Lys Val Ile Val Met Leu Thr
1460 1465 1470

Glu Leu Lys His Gly Asp Gln Glu Ile Cys Ala Gln Tyr Trp Gly
1475 1480 1485

Glu Gly Lys Gln Thr Tyr Gly Asp Ile Glu Val Asp Leu Lys Asp
1490 1495 1500

Thr Asp Lys Ser Ser Thr Tyr Thr Leu Arg Val Phe Glu Leu Arg
1505 1510 1515

His Ser Lys Arg Lys Asp Ser Arg Thr Val Tyr Gln Tyr Gln Tyr
1520 1525 1530

Thr Asn Trp Ser Val Glu Gln Leu Pro Ala Glu Pro Lys Glu Leu
1535 1540 1545

ES 2 777 801 T3

Ile Ser Met Ile Gln Val Val Lys Gln Lys Leu Pro Gln Lys Asn
 1550 1555 1560

Ser Ser Glu Gly Asn Lys His His Lys Ser Thr Pro Leu Leu Ile
 1565 1570 1575

His Cys Arg Asp Gly Ser Gln Gln Thr Gly Ile Phe Cys Ala Leu
 1580 1585 1590

Leu Asn Leu Leu Glu Ser Ala Glu Thr Glu Glu Val Val Asp Ile
 1595 1600 1605

Phe Gln Val Val Lys Ala Leu Arg Lys Ala Arg Pro Gly Met Val
 1610 1615 1620

Ser Thr Phe Glu Gln Tyr Gln Phe Leu Tyr Asp Val Ile Ala Ser
 1625 1630 1635

Thr Tyr Pro Ala Gln Asn Gly Gln Val Lys Lys Asn Asn His Gln
 1640 1645 1650

Glu Asp Lys Ile Glu Phe Asp Asn Glu Val Asp Lys Val Lys Gln
 1655 1660 1665

Asp Ala Asn Cys Val Asn Pro Leu Gly Ala Pro Glu Lys Leu Pro
 1670 1675 1680

Glu Ala Lys Glu Gln Ala Glu Gly Ser Glu Pro Thr Ser Gly Thr
 1685 1690 1695

Glu Gly Pro Glu His Ser Val Asn Gly Pro Ala Ser Pro Ala Leu
 1700 1705 1710

Asn Gln Gly Ser
 1715

<210> 6
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> construcción de ácido que comprende una secuencia de proteína de retención de tyrp-1

10

<400> 6

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

ES 2 777 801 T3

Gln Tyr Gln Cys Tyr Ala Glu Glu Tyr Glu Lys Leu Gln Asn Pro Asn
 20 25 30

Gln Ser Val Val
 35

<210> 7
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de espaciador, bisagra-CH2CH3 de IgG1 humana

<400> 7

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

ES 2 777 801 T3

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp
 225 230

5 <210> 8
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia de espaciador, pedúnculo de CD8 humana
 <400> 8

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile
 35 40 45

15 <210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> secuencia de espaciador, bisagra de IgG1 humana
 <400> 9

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

25 Lys Asp Pro Lys
 20

30 <210> 10
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de espaciador, ectodominio CD2

ES 2 777 801 T3

<400> 10

Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp
1 5 10 15

Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp
20 25 30

Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg
35 40 45

Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys
50 55 60

Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile
65 70 75 80

Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys
85 90 95

Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser
100 105 110

Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr
115 120 125

Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser
130 135 140

Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe
145 150 155 160

Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro
165 170 175

Val Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu Asp
180 185

- 5 <210> 11
- <211> 259
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> secuencia de espaciador, ectodominio CD34

<400> 11

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

15

ES 2 777 801 T3

Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Tyr Gln Glu Thr Thr Thr
 20 25 30

Pro Ser Thr Leu Gly Ser Thr Ser Leu His Pro Val Ser Gln His Gly
 35 40 45

Asn Glu Ala Thr Thr Asn Ile Thr Glu Thr Thr Val Lys Phe Thr Ser
 50 55 60

Thr Ser Val Ile Thr Ser Val Tyr Gly Asn Thr Asn Ser Ser Val Gln
 65 70 75 80

Ser Gln Thr Ser Val Ile Ser Thr Val Phe Thr Thr Pro Ala Asn Val
 85 90 95

Ser Thr Pro Glu Thr Thr Leu Lys Pro Ser Leu Ser Pro Gly Asn Val
 100 105 110

Ser Asp Leu Ser Thr Thr Ser Thr Ser Leu Ala Thr Ser Pro Thr Lys
 115 120 125

Pro Tyr Thr Ser Ser Ser Pro Ile Leu Ser Asp Ile Lys Ala Glu Ile
 130 135 140

Lys Cys Ser Gly Ile Arg Glu Val Lys Leu Thr Gln Gly Ile Cys Leu
 145 150 155 160

Glu Gln Asn Lys Thr Ser Ser Cys Ala Glu Phe Lys Lys Asp Arg Gly
 165 170 175

Glu Gly Leu Ala Arg Val Leu Cys Gly Glu Glu Gln Ala Asp Ala Asp
 180 185 190

Ala Gly Ala Gln Val Cys Ser Leu Leu Leu Ala Gln Ser Glu Val Arg
 195 200 205

Pro Gln Cys Leu Leu Leu Val Leu Ala Asn Arg Thr Glu Ile Ser Ser
 210 215 220

Lys Leu Gln Leu Met Lys Lys His Gln Ser Asp Leu Lys Lys Leu Gly
 225 230 235 240

Ile Leu Asp Phe Thr Glu Gln Asp Val Ala Ser His Gln Ser Tyr Ser
 245 250 255

Gln Lys Thr

<210> 12
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 777 801 T3

<220>

<223> que comprende el dominio transmembrana CD28 y el endodominio Z CD3

5

<400> 12

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

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

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu
35 40 45

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
50 55 60

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
65 70 75 80

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
85 90 95

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
100 105 110

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
115 120 125

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
130 135 140

<210> 13

<211> 180

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> que comprende el dominio transmembrana CD28 y los endodominios Zeta CD28 y CD3

15

<400> 13

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

20

ES 2 777 801 T3

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

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

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

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

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
 85 90 95

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

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

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

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

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

Leu Pro Pro Arg
 180

<210> 14
 <211> 216
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> que comprende el dominio transmembrana CD28 y los endodominios CD28 OX40 y CD3 Zeta

<400> 14

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

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

ES 2 777 801 T3

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

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

Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro
 65 70 75 80

Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp
 85 90 95

Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 100 105 110

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 115 120 125

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 130 135 140

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 145 150 155 160

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 165 170 175

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 180 185 190

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
 195 200 205

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 210 215

- <210> 15
- <211> 729
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> secuencia transmembrana y del endodominio de CD45
- <400> 15

Ala Leu Ile Ala Phe Leu Ala Phe Leu Ile Ile Val Thr Ser Ile Ala
 1 5 10 15

ES 2 777 801 T3

Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Ile Tyr Asp Leu His Lys Lys Arg Ser
 20 25 30

Cys Asn Leu Asp Glu Gln Gln Glu Leu Val Glu Arg Asp Asp Glu Lys
 35 40 45

Gln Leu Met Asn Val Glu Pro Ile His Ala Asp Ile Leu Leu Glu Thr
 50 55 60

Tyr Lys Arg Lys Ile Ala Asp Glu Gly Arg Leu Phe Leu Ala Glu Phe
 65 70 75 80

Gln Ser Ile Pro Arg Val Phe Ser Lys Phe Pro Ile Lys Glu Ala Arg
 85 90 95

Lys Pro Phe Asn Gln Asn Lys Asn Arg Tyr Val Asp Ile Leu Pro Tyr
 100 105 110

Asp Tyr Asn Arg Val Glu Leu Ser Glu Ile Asn Gly Asp Ala Gly Ser
 115 120 125

Asn Tyr Ile Asn Ala Ser Tyr Ile Asp Gly Phe Lys Glu Pro Arg Lys
 130 135 140

Tyr Ile Ala Ala Gln Gly Pro Arg Asp Glu Thr Val Asp Asp Phe Trp
 145 150 155 160

Arg Met Ile Trp Glu Gln Lys Ala Thr Val Ile Val Met Val Thr Arg
 165 170 175

Cys Glu Glu Gly Asn Arg Asn Lys Cys Ala Glu Tyr Trp Pro Ser Met
 180 185 190

Glu Glu Gly Thr Arg Ala Phe Gly Asp Val Val Val Lys Ile Asn Gln
 195 200 205

His Lys Arg Cys Pro Asp Tyr Ile Ile Gln Lys Leu Asn Ile Val Asn
 210 215 220

Lys Lys Glu Lys Ala Thr Gly Arg Glu Val Thr His Ile Gln Phe Thr
 225 230 235 240

Ser Trp Pro Asp His Gly Val Pro Glu Asp Pro His Leu Leu Leu Lys
 245 250 255

Leu Arg Arg Arg Val Asn Ala Phe Ser Asn Phe Phe Ser Gly Pro Ile
 260 265 270

ES 2 777 801 T3

Val Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Thr Tyr Ile Gly
 275 280 285

Ile Asp Ala Met Leu Glu Gly Leu Glu Ala Glu Asn Lys Val Asp Val
 290 295 300

Tyr Gly Tyr Val Val Lys Leu Arg Arg Gln Arg Cys Leu Met Val Gln
 305 310 315 320

Val Glu Ala Gln Tyr Ile Leu Ile His Gln Ala Leu Val Glu Tyr Asn
 325 330 335

Gln Phe Gly Glu Thr Glu Val Asn Leu Ser Glu Leu His Pro Tyr Leu
 340 345 350

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

Ala Glu Phe Gln Arg Leu Pro Ser Tyr Arg Ser Trp Arg Thr Gln His
 370 375 380

Ile Gly Asn Gln Glu Glu Asn Lys Ser Lys Asn Arg Asn Ser Asn Val
 385 390 395 400

Ile Pro Tyr Asp Tyr Asn Arg Val Pro Leu Lys His Glu Leu Glu Met
 405 410 415

Ser Lys Glu Ser Glu His Asp Ser Asp Glu Ser Ser Asp Asp Asp Ser
 420 425 430

Asp Ser Glu Glu Pro Ser Lys Tyr Ile Asn Ala Ser Phe Ile Met Ser
 435 440 445

Tyr Trp Lys Pro Glu Val Met Ile Ala Ala Gln Gly Pro Leu Lys Glu
 450 455 460

Thr Ile Gly Asp Phe Trp Gln Met Ile Phe Gln Arg Lys Val Lys Val
 465 470 475 480

Ile Val Met Leu Thr Glu Leu Lys His Gly Asp Gln Glu Ile Cys Ala
 485 490 495

Gln Tyr Trp Gly Glu Gly Lys Gln Thr Tyr Gly Asp Ile Glu Val Asp
 500 505 510

Leu Lys Asp Thr Asp Lys Ser Ser Thr Tyr Thr Leu Arg Val Phe Glu
 515 520 525

ES 2 777 801 T3

Leu Arg His Ser Lys Arg Lys Asp Ser Arg Thr Val Tyr Gln Tyr Gln
 530 535 540

Tyr Thr Asn Trp Ser Val Glu Gln Leu Pro Ala Glu Pro Lys Glu Leu
 545 550 555 560

Ile Ser Met Ile Gln Val Val Lys Gln Lys Leu Pro Gln Lys Asn Ser
 565 570 575

Ser Glu Gly Asn Lys His His Lys Ser Thr Pro Leu Leu Ile His Cys
 580 585 590

Arg Asp Gly Ser Gln Gln Thr Gly Ile Phe Cys Ala Leu Leu Asn Leu
 595 600 605

Leu Glu Ser Ala Glu Thr Glu Glu Val Val Asp Ile Phe Gln Val Val
 610 615 620

Lys Ala Leu Arg Lys Ala Arg Pro Gly Met Val Ser Thr Phe Glu Gln
 625 630 635 640

Tyr Gln Phe Leu Tyr Asp Val Ile Ala Ser Thr Tyr Pro Ala Gln Asn
 645 650 655

Gly Gln Val Lys Lys Asn Asn His Gln Glu Asp Lys Ile Glu Phe Asp
 660 665 670

Asn Glu Val Asp Lys Val Lys Gln Asp Ala Asn Cys Val Asn Pro Leu
 675 680 685

Gly Ala Pro Glu Lys Leu Pro Glu Ala Lys Glu Gln Ala Glu Gly Ser
 690 695 700

Glu Pro Thr Ser Gly Thr Glu Gly Pro Glu His Ser Val Asn Gly Pro
 705 710 715 720

Ala Ser Pro Ala Leu Asn Gln Gly Ser
 725

5 <210> 16
 <211> 362
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia transmembrana y del endodominio de CD148

<400> 16

ES 2 777 801 T3

Ala Val Phe Gly Cys Ile Phe Gly Ala Leu Val Ile Val Thr Val Gly
 1 5 10 15

Gly Phe Ile Phe Trp Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ala Lys Asn Asn Glu
 20 25 30

Val Ser Phe Ser Gln Ile Lys Pro Lys Lys Ser Lys Leu Ile Arg Val
 35 40 45

Glu Asn Phe Glu Ala Tyr Phe Lys Lys Gln Gln Ala Asp Ser Asn Cys
 50 55 60

Gly Phe Ala Glu Glu Tyr Glu Asp Leu Lys Leu Val Gly Ile Ser Gln
 65 70 75 80

Pro Lys Tyr Ala Ala Glu Leu Ala Glu Asn Arg Gly Lys Asn Arg Tyr
 85 90 95

Asn Asn Val Leu Pro Tyr Asp Ile Ser Arg Val Lys Leu Ser Val Gln
 100 105 110

Thr His Ser Thr Asp Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Met Pro Gly Tyr
 115 120 125

His Ser Lys Lys Asp Phe Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Pro Asn Thr
 130 135 140

Leu Lys Asp Phe Trp Arg Met Val Trp Glu Lys Asn Val Tyr Ala Ile
 145 150 155 160

Ile Met Leu Thr Lys Cys Val Glu Gln Gly Arg Thr Lys Cys Glu Glu
 165 170 175

Tyr Trp Pro Ser Lys Gln Ala Gln Asp Tyr Gly Asp Ile Thr Val Ala
 180 185 190

Met Thr Ser Glu Ile Val Leu Pro Glu Trp Thr Ile Arg Asp Phe Thr
 195 200 205

Val Lys Asn Ile Gln Thr Ser Glu Ser His Pro Leu Arg Gln Phe His
 210 215 220

Phe Thr Ser Trp Pro Asp His Gly Val Pro Asp Thr Thr Asp Leu Leu
 225 230 235 240

Ile Asn Phe Arg Tyr Leu Val Arg Asp Tyr Met Lys Gln Ser Pro Pro
 245 250 255

ES 2 777 801 T3

Glu Ser Pro Ile Leu Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly
 260 265 270

Thr Phe Ile Ala Ile Asp Arg Leu Ile Tyr Gln Ile Glu Asn Glu Asn
 275 280 285

Thr Val Asp Val Tyr Gly Ile Val Tyr Asp Leu Arg Met His Arg Pro
 290 295 300

Leu Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Val Phe Leu Asn Gln Cys Val
 305 310 315 320

Leu Asp Ile Val Arg Ser Gln Lys Asp Ser Lys Val Asp Leu Ile Tyr
 325 330 335

Gln Asn Thr Thr Ala Met Thr Ile Tyr Glu Asn Leu Ala Pro Val Thr
 340 345 350

Thr Phe Gly Lys Thr Asn Gly Tyr Ile Ala
 355 360

<210> 17
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> polipéptido marcador/suicida

10

<400> 17

Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Pro
 20 25 30

Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys
 35 40 45

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
 50 55 60

Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
 65 70 75 80

Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 85 90 95

ES 2 777 801 T3

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
100 105 110

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Arg Arg Val
115 120 125

Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val
130 135

5 <210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sitio de escisión
<400> 18

Asp Met Glu Ser Asn Pro Gly Pro
1 5

15 <210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> sitio de escisión
<400> 19

Asp Val Glu Leu Asn Pro Gly Pro
1 5

25
30 <210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> sitio de escisión
<400> 20

Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
1 5

40 <210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> sitio de escisión
<400> 21

ES 2 777 801 T3

Asp Ile Glu Leu Asn Pro Gly Pro
1 5

5 <210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sitio de escisión

<400> 22

Asp Ile Glu Gln Asn Pro Gly Pro
1 5

15 <210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> sitio de escisión

<400> 23

25

Asp Ser Glu Phe Asn Pro Gly Pro
1 5

30 <210> 24
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> secuencia de escisión

<400> 24

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

Pro Gly Pro

40 <210> 25
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> secuencia de escisión

<400> 25

ES 2 777 801 T3

Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Gln Ser Asn

1 5 10 15

Pro Gly Pro

5 <210> 26
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia de escisión
<400> 26

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

Pro Gly Pro

15 <210> 27
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> secuencia de escisión
<400> 27

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

25 Pro Gly Pro

30 <210> 28
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de escisión
35 <400> 28

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

Pro Gly Pro

40 <210> 29
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 777 801 T3

<220>

<223> secuencia de escisión

<400> 29

5

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

Pro Gly Pro

<210> 30

<211> 19

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de escisión

15

<400> 30

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

Pro Gly Pro

20

<210> 31

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> secuencia de escisión

<400> 31

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

30

Pro Gly Gly

<210> 32

<211> 20

35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia similar a 2A

40

<400> 32

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

ES 2 777 801 T3

<210> 33
<211> 20
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia similar a 2A

10 <400> 33

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

<220>
20 <223> secuencia similar a 2A

<400> 34

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

25 <210> 35
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> secuencia similar a 2A

<400> 35

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

Pro Gly Pro

<210> 36
40 <211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> secuencia similar a 2A

<400> 36

ES 2 777 801 T3

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

Pro Gly Pro

5 <210> 37
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia similar a 2A
 10 <400> 37

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> 38
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> secuencia similar a 2A
 <400> 38

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> 39
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> secuencia similar a 2A
 35 <400> 39

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> 40
 <211> 20

ES 2 777 801 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> secuencia similar a 2A

 <400> 40

 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
 10
 <210> 41
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> secuencia similar a 2A

 <400> 41
 20
 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> 42
 <211> 20
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia similar a 2A
 30
 <400> 42

 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
 35
 <210> 43
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> secuencia similar a 2A

 <400> 43

ES 2 777 801 T3

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

5 <210> 44
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> secuencia de escisión
 <400> 44

Val Thr Glu Leu Leu Tyr Arg Met Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro
 1 5 10 15

Arg Pro Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile
 20 25 30

Val Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
 35 40 45

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 50 55

15 <210> 45
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> secuencia de escisión
 <400> 45

Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val
 1 5 10 15

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly
 20 25 30

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 35 40

25 <210> 46
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> secuencia de escisión
 35 <400> 46

ES 2 777 801 T3

Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu
 1 5 10 15

Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
 20 25 30

Pro

5 <210> 47
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia de escisión

<400> 47

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

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 20

15 <210> 48
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> enlazador

25 <400> 48

Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5

30 <210> 49
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> señal de retención intracelular

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

40 <400> 49

Asn Pro Phe Xaa
 1

45 <210> 50

ES 2 777 801 T3

<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5 <220>
<223> señal de retención intracelular

<400> 50

Lys Asp Glu Leu
1

10

<210> 51
<211> 4
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> señal de retención intracelular

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
25 <400> 51

Lys Lys Xaa Xaa
1

30 <210> 52
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> señal de retención intracelular

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
40 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(5)
45 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 52

Lys Xaa Lys Xaa Xaa
1 5

50 <210> 53
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
55 <220>
<223> señal de retención intracelular

ES 2 777 801 T3

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
5
<400> 53

Asn Pro Xaa Tyr
1

10 <210> 54
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> señal de retención intracelular

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba voluminosa
<400> 54

Tyr Xaa Xaa Xaa
1

30

35 <210> 55
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> señal de retención intracelular

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(5)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<400> 55

Asp Glu Xaa Xaa Xaa Leu Leu Ile
1 5

50 <210> 56
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> señal de retención intracelular

<220>
<221> misc_feature

ES 2 777 801 T3

<222> (2)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

5 <400> 56

Asp Xaa Xaa Leu Leu
1 5

10 <210> 57
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> señal de retención intracelular

<400> 57

Asp Pro Phe Trp
1

20 <210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> señal de retención intracelular

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 58

Phe Xaa Asp Xaa Phe
1 5

40 <210> 59
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> señal de retención intracelular

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba voluminosa

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

ES 2 777 801 T3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba voluminosa
 5
 <400> 59

 Leu Xaa Xaa Xaa Asp Glu
 1 5

 10 <210> 60
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> señal de retención intracelular

 <400> 60

 Leu Leu Asp Leu Leu
 1 5

 20

 <210> 61
 <211> 5
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> señal de retención intracelular

 30 <400> 61

 Pro Trp Asp Leu Trp
 1 5

 35 <210> 62
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 62
 40
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Ile Leu Trp Val Leu Leu Leu Leu Val Pro
 1 5 10 15

 Gly Ser Thr Gly
 20

 45 <210> 63
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido de señal derivado de CD8a humana
 50
 <400> 63

ES 2 777 801 T3

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

5
<210> 64
<211> 248
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> scFv aCD19
<400> 64

ES 2 777 801 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Lys Ala Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser
 130 135 140
 Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp
 145 150 155 160
 Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp
 165 170 175
 Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu
 180 185 190
 Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe
 195 200 205
 Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 225 230 235 240
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 245

<210> 65
 <211> 47
 <212> PRT

ES 2 777 801 T3

<213> Homo sapiens

<400> 65

Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile
1 5 10 15

Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala
20 25 30

Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile
35 40 45

5

<210> 66

<211> 27

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<400> 66

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

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25

15

<210> 67

<211> 113

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 67

ES 2 777 801 T3

Arg Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
1 5 10 15

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
20 25 30

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
35 40 45

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
50 55 60

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
65 70 75 80

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
85 90 95

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
100 105 110

Arg

5 <210> 68
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido 2A

<400> 68

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> 69
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> péptido de señal derivado de la cadena kappa de la Ig de ratón

<400> 69

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

25 Asp Ala

ES 2 777 801 T3

<210> 70
<211> 254
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> scFv aCD33

10

<400> 70

Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr
20 25 30

Phe Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Lys Asn Tyr
85 90 95

Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Gly

ES 2 777 801 T3

	100		105		110														
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly			
			115					120					125						
	Gly	Gly	Ser	Arg	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu			
		130					135					140							
	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe			
	145					150					155					160			
	Thr	Leu	Ser	Asn	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys			
				165						170					175				
	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr			
				180						185				190					
	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala			
			195					200					205						
	Lys	Ser	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr			
		210					215					220							
	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Gln	Asp	Ala	Tyr	Thr	Gly	Gly	Tyr	Phe			
	225					230					235					240			
	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Met					
				245						250									

<210> 71
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> bisagra y Fc derivado de IgG1 humana

10

<400> 71

ES 2 777 801 T3

Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 20 25 30
 Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 35 40 45
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 50 55 60
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 65 70 75 80
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 85 90 95
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 100 105 110
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 115 120 125
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 130 135 140
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 145 150 155 160
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 165 170 175
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 195 200 205
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 72
<211> 4

ES 2 777 801 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> enlazador

<400> 72

Lys Asp Pro Lys
1

10

<210> 73
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<400> 73

Ala Val Phe Gly Cys Ile Phe Gly Ala Leu Val Ile Val Thr Val Gly
1 5 10 15

Gly Phe Ile Phe Trp
20

20 <210> 74
<211> 341
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 74

ES 2 777 801 T3

Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ala Lys Asn Asn Glu Val Ser Phe Ser Gln
 1 5 10 15

Ile Lys Pro Lys Lys Ser Lys Leu Ile Arg Val Glu Asn Phe Glu Ala
 20 25 30

Tyr Phe Lys Lys Gln Gln Ala Asp Ser Asn Cys Gly Phe Ala Glu Glu
 35 40 45

Tyr Glu Asp Leu Lys Leu Val Gly Ile Ser Gln Pro Lys Tyr Ala Ala
 50 55 60

Glu Leu Ala Glu Asn Arg Gly Lys Asn Arg Tyr Asn Asn Val Leu Pro
 65 70 75 80

Tyr Asp Ile Ser Arg Val Lys Leu Ser Val Gln Thr His Ser Thr Asp
 85 90 95

Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Met Pro Gly Tyr His Ser Lys Lys Asp
 100 105 110

Phe Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Pro Asn Thr Leu Lys Asp Phe Trp
 115 120 125

Arg Met Val Trp Glu Lys Asn Val Tyr Ala Ile Ile Met Leu Thr Lys
 130 135 140

Cys Val Glu Gln Gly Arg Thr Lys Cys Glu Glu Tyr Trp Pro Ser Lys
 145 150 155 160

Gln Ala Gln Asp Tyr Gly Asp Ile Thr Val Ala Met Thr Ser Glu Ile
 165 170 175

ES 2 777 801 T3

Val Leu Pro Glu Trp Thr Ile Arg Asp Phe Thr Val Lys Asn Ile Gln
 180 185 190

Thr Ser Glu Ser His Pro Leu Arg Gln Phe His Phe Thr Ser Trp Pro
 195 200 205

Asp His Gly Val Pro Asp Thr Thr Asp Leu Leu Ile Asn Phe Arg Tyr
 210 215 220

Leu Val Arg Asp Tyr Met Lys Gln Ser Pro Pro Glu Ser Pro Ile Leu
 225 230 235 240

Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Thr Phe Ile Ala Ile
 245 250 255

Asp Arg Leu Ile Tyr Gln Ile Glu Asn Glu Asn Thr Val Asp Val Tyr
 260 265 270

Gly Ile Val Tyr Asp Leu Arg Met His Arg Pro Leu Met Val Gln Thr
 275 280 285

Glu Asp Gln Tyr Val Phe Leu Asn Gln Cys Val Leu Asp Ile Val Arg
 290 295 300

Ser Gln Lys Asp Ser Lys Val Asp Leu Ile Tyr Gln Asn Thr Thr Ala
 305 310 315 320

Met Thr Ile Tyr Glu Asn Leu Ala Pro Val Thr Thr Phe Gly Lys Thr
 325 330 335

Asn Gly Tyr Ile Ala
 340

<210> 75
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 75

Ala Leu Ile Ala Phe Leu Ala Phe Leu Ile Ile Val Thr Ser Ile Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Val Val Leu Tyr
 20

10

<210> 76
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

ES 2 777 801 T3

<400> 76

Met Glu Thr Asp
1

5

<210> 77
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10

<400> 77

Thr Leu Ile Leu Trp Val Leu Leu Leu Leu Val
1 5 10

15

<210> 78
<211> 5
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20

<400> 78

Pro Gly Ser Thr Gly
1 5

25

<210> 79
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 79

Met Asn Arg Gly Val Pro Phe Arg His Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu
1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Ala Ala Thr Gln Gly
20 25

35

<210> 80
<211> 23
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 80

Met Tyr Leu Trp Leu Lys Leu Leu Ala Phe Gly Phe Ala Phe Leu Asp
1 5 10 15

40

Thr Glu Val Phe Val Thr Gly
20

45

<210> 81
<211> 21
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 777 801 T3

<400> 81

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

His Ala Ala Arg Pro
 20

5 <210> 82
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 82

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

His Gly Asn Ser Val
 20

15 <210> 83
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 83

Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn
 1 5 10 15

Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser
 20

25 <210> 84
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 84

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly
 20

30 <210> 85
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 85

ES 2 777 801 T3

Met Ala Gly Pro Pro Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Ala Arg Gly Leu Pro Gly Ala Leu Ala
20 25

5 <210> 86
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

Met Ser Ala Pro Lys Leu Leu Ser Leu Gly Cys Ile Phe Phe Pro Leu
1 5 10 15

10 Leu Leu Phe Gln Gln Ala Arg Ala
20

15 <210> 87
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87

Met Arg Phe Phe Val Pro Leu Phe Leu Val Gly Ile Leu Phe Pro Ala
1 5 10 15

20 Ile Leu Ala

25 <210> 88
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

Met Pro Gly Phe Leu Val Arg Ile Leu Pro Leu Leu Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Gly Pro Thr Arg Gly
20

30 <210> 89
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 89

ES 2 777 801 T3

Met Lys Arg Phe Leu Phe Leu Leu Leu Thr Ile Ser Leu Leu Val Met
1 5 10 15

Val Gln Ile Gln Thr Gly Leu Ser
20

5 <210> 90
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90

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

Thr Ala Ala Leu Ala
20

10

15 <210> 91
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 91

Met Gly Pro Thr Ser Gly Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Thr His
1 5 10 15

Leu Pro Leu Ala Leu Gly
20

20

25 <210> 92
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92

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

Asp Ala

30 <210> 93
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 93

ES 2 777 801 T3

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Arg
20

5 <210> 94
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 94

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

10 Gly Ala Tyr Gly
20

15 <210> 95
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 95

Met Ala Trp Ala Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala His Cys Thr Asp
1 5 10 15

20 Cys Trp Ala

25 <210> 96
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 96

Met Leu Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu
1 5 10 15

30 Pro Leu Leu Gly Val Gly
20

35 <210> 97
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 97

ES 2 777 801 T3

Met Ala Trp Ala Ser Arg Leu Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Pro
1 5 10 15

Val Val Gly Ala
20

5 <210> 98
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 98

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

10 Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly
20

15 <210> 99
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> motivo ITAM

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser Leu o Ile

30 <400> 99

Tyr Xaa Xaa Xaa
1

35 <210> 100
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia diana de aminoácidos básicos de furina

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
45 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
50 <223> Xaa puede ser Arg o Lys

ES 2 777 801 T3

<400> 100

Arg Xaa Xaa Arg
1

5 <210> 101
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sitio de escisión consenso del virus del grabado del tabaco (VGT)

<400> 101

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser
1 5

15 <210> 102
<211> 8
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> motivo implicado en la actividad de escisión

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35 <400> 102

Asp Xaa Glu Xaa Asn Pro Gly Pro
1 5

40 <210> 103
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> sitio de escisión

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
50 <223> Xaa puede ser Ile, Val, Met o Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
55 <223> Xaa puede ser Thr, Met, Ser, Leu, Glu, Gln o Phe

<400> 103

ES 2 777 801 T3

Asp Xaa Glu Xaa Asn Pro Gly Pro
1 5

5 <210> 104
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> señal C-terminal, motivo de los canales de potasio

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 104

Arg Xaa Arg Arg
1

20 <210> 105
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 105

Ile Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr
1 5 10

30 <210> 106
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 106

Val Glu Ile Gly Asn Pro Thr Tyr Lys Met Tyr Glu
1 5 10

40 <210> 107
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 107

Thr Asn Phe Thr Asn Pro Val Tyr Ala Thr Leu Tyr
1 5 10

45 <210> 108
<211> 12
<212> PRT
50 <213> Drosophila sp.

<400> 108

ES 2 777 801 T3

Gly Asn Phe Ala Asn Pro Val Tyr Glu Ser Met Tyr

1

5

10

5

<210> 109
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Caenorhabditis elegans
 <400> 109

Thr Thr Phe Thr Asn Pro Val Tyr Glu Leu Glu Asp
 1 5 10

10

<210> 110
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Caenorhabditis elegans
 <400> 110

15

Leu Arg Val Asp Asn Pro Leu Tyr Asp Pro Asp Ser
 1 5 10

20

<210> 111
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 111

25

Ile Ile Phe Glu Asn Pro Met Tyr Ser Ala Arg Asp
 1 5 10

30

<210> 112
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35

<400> 112

Thr Asn Phe Glu Asn Pro Ile Tyr Ala Gln Met Glu
 1 5 10

40

<210> 113
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45

<400> 113

Asp Thr Gly Glu Asn Pro Ile Tyr Lys Ser Ala Val
 1 5 10

<210> 114
 <211> 11

ES 2 777 801 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 114

5

Thr Thr Val Val Asn Pro Lys Tyr Glu Gly Lys
1 5 10

<210> 115
<211> 12
<212> PRT
<213> Drosophila sp.

10

<400> 115

Trp Asp Thr Glu Asn Pro Ile Tyr Lys Gln Ala Thr
1 5 10

15

<210> 116
<211> 11
<212> PRT
<213> Drosophila sp.

20

<400> 116

Ser Thr Phe Lys Asn Pro Met Tyr Ala Gly Lys
1 5 10

25

<210> 117
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 117

His Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Arg Phe Leu Glu
1 5 10

35

<210> 118
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

<400> 118

Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu
1 5 10

45

<210> 119
<211> 12
<212> PRT
<213> Drosophila sp.

50

<400> 119

Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Tyr Phe Glu
1 5 10

ES 2 777 801 T3

<210> 120
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5
<400> 120

Tyr Ala Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Leu Ser Ala Ser
1 5 10

10
<210> 121
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
15
<400> 121

Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln Pro
1 5 10

20
<210> 122
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
25
<400> 122

Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val
1 5 10

30
<210> 123
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
35
<400> 123

Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe
1 5 10

40
<210> 124
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
45
<400> 124

Arg Lys Arg Ser His Ala Gly Tyr Gln Thr Ile
1 5 10

50
<210> 125
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
50
<400> 125

ES 2 777 801 T3

Lys His His His Ala Gly Tyr Glu Gln Phe
 1 5 10

5 <210> 126
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus
 <400> 126

Lys Lys His His Asn Thr Gly Tyr Glu Gln Phe
 1 5 10

10 <210> 127
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus
 <400> 127

Arg Arg Lys Ser Arg Thr Gly Tyr Gln Ser Val
 1 5 10

20 <210> 128
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus
 <400> 128

Arg Arg Lys Ser Tyr Ala Gly Tyr Gln Thr Leu
 1 5 10

30 <210> 129
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Drosophila sp.
 <400> 129

Arg Arg Arg Ser Thr Ser Arg Gly Tyr Met Ser Phe
 1 5 10

40 <210> 130
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Lumbricus terrestris
 <400> 130

Arg Lys Arg Ser Arg Arg Gly Tyr Glu Ser Val
 1 5 10

50 <210> 131
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 777 801 T3

<400> 131

Lys Ser Ile Arg Ser Gly Tyr Glu Val Met
1 5 10

5 <210> 132
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 132

His Cys Gly Gly Pro Arg Pro Gly Tyr Glu Thr Leu
1 5 10

15 <210> 133
<211> 12
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20 <400> 133

His Cys Arg Thr Arg Arg Ala Glu Tyr Glu Thr Leu
1 5 10

25 <210> 134
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 134

Arg Arg Arg Pro Ser Ala Tyr Gln Ala Leu
1 5 10

30 <210> 135
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 135

Arg Arg Arg Ser Tyr Gln Asn Ile Pro
1 5

40 <210> 136
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 136

Lys Lys His Cys Ser Tyr Gln Asp Ile Leu
1 5 10

50 <210> 137
<211> 10

ES 2 777 801 T3

<212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 137
 5
 Arg Arg Arg Ser Ala Tyr Gln Asp Ile Arg
 1 5 10

 <210> 138
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 138
 10
 Arg Lys Arg Arg Arg Ser Tyr Gln Asp Ile Met
 1 5 10

 <210> 139
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 139
 15
 Lys Phe Cys Lys Ser Lys Glu Arg Asn Tyr His Thr Leu
 1 5 10

 <210> 140
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Drosophila sp.*
 <400> 140
 20
 Lys Phe Tyr Lys Ala Arg Asn Glu Arg Asn Tyr His Thr Leu
 1 5 10

 <210> 141
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 141
 25
 Lys Ile Arg Leu Arg Cys Gln Ser Ser Gly Tyr Gln Arg Ile
 1 5 10

 <210> 142
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 142
 30
 Lys Ile Arg Gln Arg His Gln Ser Ser Ala Tyr Gln Arg Ile
 1 5 10

 <210> 141
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 141
 35
 Lys Ile Arg Leu Arg Cys Gln Ser Ser Gly Tyr Gln Arg Ile
 1 5 10

 <210> 142
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 142
 40
 Lys Ile Arg Gln Arg His Gln Ser Ser Ala Tyr Gln Arg Ile
 1 5 10

 <210> 141
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 141
 45
 Lys Ile Arg Gln Arg His Gln Ser Ser Ala Tyr Gln Arg Ile
 1 5 10

 <210> 142
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 142
 50
 Lys Ile Arg Gln Arg His Gln Ser Ser Ala Tyr Gln Arg Ile
 1 5 10

ES 2 777 801 T3

<210> 143
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 143

 His Phe Cys Leu Tyr Arg Lys Arg Pro Gly Tyr Asp Gln Leu Asn
 1 5 10 15

 10
 <210> 144
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 15
 <400> 144

 Ser Leu Ser Arg Gly Ser Gly Tyr Lys Glu Ile
 1 5 10

 20
 <210> 145
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 25
 <400> 145

 Arg Arg Leu Arg Lys Gly Tyr Thr Pro Leu Met Glu Thr
 1 5 10

 30
 <210> 146
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 146

 Arg Arg Ala Gly His Ser Ser Tyr Thr Pro Leu Pro Gly Ser
 1 5 10

 35

 40
 <210> 147
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Dictyostelium sp.

 <400> 147

 Lys Lys Leu Arg Gln Gln Lys Gln Gln Gly Tyr Gln Ala Ile Ile Asn
 1 5 10 15

 Asn Glu

 45
 <210> 148
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Dictyostelium sp.

 50

ES 2 777 801 T3

<400> 148

Arg Ser Lys Ser Asn Gln Asn Gln Ser Tyr Asn Leu Ile Gln Leu
 1 5 10 15

5 <210> 149
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Dictyostelium sp.

10 <400> 149

Arg Lys Thr Phe Tyr Asn Asn Asn Gln Tyr Asn Gly Tyr Asn Ile Ile
 1 5 10 15

Asn

15 <210> 150
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 150

Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala
 1 5 10

25 <210> 151
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 151

30 Met Thr Lys Glu Tyr Gln Asp Leu Gln His Leu
 1 5 10

35 <210> 152
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 152

Ser Tyr Lys Tyr Ser Lys Val Asn Lys Glu
 1 5 10

40 <210> 153
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 153

Pro Ala Ala Tyr Arg Gly Val Gly Asp Asp
 1 5 10

ES 2 777 801 T3

5 <210> 154
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 154

Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr
 1 5 10

10 <210> 155
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 155

Leu Ile Ser Tyr Lys Gly Leu Pro Pro Glu
 1 5 10

20 <210> 156
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*
 25 <400> 156

Ala Ser Asp Tyr Gln Arg Leu Asn Leu Lys Leu
 1 5 10

30 <210> 157
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
 35 <400> 157

Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser Phe Gln Thr
 1 5 10

40 <210> 158
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 158

Arg Met Gln Ala Gln Pro Pro Gly Tyr Arg His Val Ala Asp Gly Glu
 1 5 10 15

Asp His Ala

45 <210> 159
 <211> 7
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

ES 2 777 801 T3

<220>
 <223> Señal de clasificación basada en dileucina

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser Asp o Glu

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser Leu o Ile

20 <400> 159

Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Leu Xaa
 1 5

25 <210> 160
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 160

30 Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn
 1 5

35 <210> 161
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 161

40 Asp Glu Arg Ala Pro Leu Ile Arg Thr
 1 5

45 <210> 162
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 162

50 Gln Glu Lys Asp Pro Leu Leu Lys Asn
 1 5

55 <210> 163
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Coturnix sp.

<400> 163

ES 2 777 801 T3

Thr Glu Arg Asn Pro Leu Leu Lys Ser
1 5

5 <210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 164

Gly Glu Asn Ser Pro Leu Leu Ser Gly
1 5

10

15 <210> 165
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 165

Glu Glu Lys Gln Pro Leu Leu Met Glu
1 5

20

25 <210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> Oryzias latipes

<400> 166

Gly Glu Arg Gln Pro Leu Leu Gln Ser
1 5

30 <210> 167
<211> 9
<212> PRT
<213> Gallus gallus

35 <400> 167

Pro Glu Ile Gln Pro Leu Leu Thr Glu
1 5

40 <210> 168
<211> 9
<212> PRT
<213> Carassius auratus

45 <400> 168

Glu Gly Arg Gln Pro Leu Leu Gly Asp
1 5

<210> 169
<211> 9

ES 2 777 801 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 169
 5
 Glu Ala Asn Gln Pro Leu Leu Thr Asp
 1 5

<210> 170
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus
 <400> 170
 10
 Glu Leu His Gln Pro Leu Leu Thr Asp
 1 5
 15

<210> 171
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Danio rerio
 <400> 171
 20
 Arg Glu Phe Glu Pro Leu Leu Asn Ala
 1 5
 25

<210> 172
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 172
 30
 Glu Glu Lys Met Ala Ile Leu Met Asp
 1 5
 35

<210> 173
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 173
 40
 Glu Glu Lys Leu Ala Ile Leu Ser Gln
 1 5
 45

<210> 174
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 174
 50
 Ser Glu Arg Asp Val Leu Leu Asp Glu
 1 5

ES 2 777 801 T3

5 <210> 175
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 175

 Ser Glu Arg Arg Asn Leu Leu Glu Asp
 1 5
 10
 <210> 176
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*
 15
 <400> 176

 Asp Asp Ser Gly Asp Leu Leu Pro Gly
 1 5
 20
 <210> 177
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 177

 Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu
 1 5
 30
 <210> 178
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Felis catus
 35
 <400> 178

 Ser His Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu
 1 5
 40
 <210> 179
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 179

 Arg Arg Thr Pro Ser Leu Leu Glu Gln
 1 5
 45
 <210> 180
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 180

ES 2 777 801 T3

His Arg Thr Pro Ser Leu Leu Glu Gln
1 5

5
<210> 181
<211> 10
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 181

Glu Pro Arg Gly Ser Arg Leu Leu Val Arg
1 5 10

10

15
<210> 182
<211> 19
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 182

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

Leu Gly Arg

20

25
<210> 183
<211> 19
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 183

Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Leu Pro Ile
1 5 10 15

Leu Gly Asn

30

35
<210> 184
<211> 20
<212> PRT
<213> *Gallus gallus*

<400> 184

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

Val Leu Pro Ile
20

40

45
<210> 185
<211> 23
<212> PRT
<213> *Danio rerio*

<400> 185

ES 2 777 801 T3

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

Ala Glu Thr Ile Leu Gly Arg
20

5 <210> 186
<211> 23
<212> PRT
<213> Danio rerio

<400> 186

Met Ser Ser Glu Gly Asn Glu Thr Pro Leu Ile Ser Asp Gln Ser Ser
1 5 10 15

10 Val Asn Met Gly Pro Gln Pro
20

15 <210> 187
<211> 24
<212> PRT
<213> Trypanosoma sp.

<400> 187

Arg Pro Arg Arg Arg Thr Glu Glu Asp Glu Leu Leu Pro Glu Glu Ala
1 5 10 15

20 Glu Gly Leu Ile Asp Pro Gln Asn
20

25 <210> 188
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 188

Pro Asp Lys His Ser Leu Leu Val Gly Asp Phe Arg Glu Asp Asp Asp
1 5 10 15

Thr Ala Leu

30 <210> 189
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 189

Thr Glu Arg Glu Arg Leu Leu Asn Phe
1 5

<210> 190

ES 2 777 801 T3

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 190

 Val Glu Thr Asp Asp Leu Ile Leu
 1 5

 <210> 191
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Caenorhabditis elegans
 10

 <400> 191
 15

 Phe Glu Asn Asp Ser Leu Leu
 1 5

 <210> 192
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 20

 <400> 192

 Asn Glu Gln Ser Pro Leu Leu His Asn
 1 5
 25

 <210> 193
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 30

 <400> 193

 Ser Glu Gln Thr Arg Leu Val Pro
 1 5
 35

 <210> 194
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 40

 <400> 194

 Glu Val Asp Leu Asp Leu Leu Lys
 1 5

 <210> 195
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45

 <400> 195
 50

ES 2 777 801 T3

Ser Phe His Asp Asp Ser Asp Glu Asp Leu Leu His Ile
 1 5 10

5 <210> 196
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
 <400> 196

Thr Phe His Asp Asp Ser Asp Glu Asp Leu Leu His Val
 1 5 10

10 <210> 197
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 15 <400> 197

Ser Phe His Asp Asp Ser Asp Glu Asp Leu Leu Asn Ile
 1 5 10

20 <210> 198
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus
 25 <400> 198

Ser Phe His Asp Asp Ser Asp Glu Asp Leu Leu Asn Val
 1 5 10

30 <210> 199
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 199

Glu Glu Ser Glu Glu Arg Asp Asp His Leu Leu Pro Met
 1 5 10

40 <210> 200
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus
 45 <400> 200

Asp Glu Ser Glu Glu Arg Asp Asp His Leu Leu Pro Met

1 5 10

50 <210> 201

ES 2 777 801 T3

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 201

Gly Tyr His Asp Asp Ser Asp Glu Asp Leu Leu Glu
 1 5 10

<210> 202
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 202

15

Ile Thr Gly Phe Ser Asp Asp Val Pro Met Val Ile Ala
 1 5 10

<210> 203
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Hydra sp.

20

<400> 203

25

Ile Asn Arg Phe Ser Asp Asp Glu Pro Leu Val Val Ala
 1 5 10

<210> 204
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 204

Met Leu Glu Ala Ser Asp Asp Glu Ala Leu Leu Val Cys
 1 5 10

35

<210> 205
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<400> 205

Lys Asn Glu Thr Ser Asp Asp Glu Ala Leu Leu Leu Cys
 1 5 10

45

<210> 206
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

50

<400> 206

Trp Val Val Glu Ala Glu Asp Glu Pro Leu Leu Ala
 1 5 10

ES 2 777 801 T3

5 <210> 207
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 207

Trp Val Ala Glu Ala Glu Asp Glu Pro Leu Leu Thr
 1 5 10

10 <210> 208
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 208

His Asp Asp Phe Ala Asp Asp Ile Ser Leu Leu Lys
 1 5 10

20 <210> 209
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25 <400> 209

Gly Arg Asp Ser Pro Glu Asp His Ser Leu Leu Val Asn
 1 5 10

30 <210> 210
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Peromyscus maniculatus*
 35 <400> 210

Val Arg Cys His Pro Glu Asp Asp Arg Leu Leu Gly
 1 5 10

40 <210> 211
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 211

His Arg Val Ser Gln Asp Asp Leu Asp Leu Leu Thr Ser
 1 5 10

45 <210> 212
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 212

ES 2 777 801 T3

Ala Ser Val Ser Leu Leu Asp Asp Glu Leu Met Ser Leu
 1 5 10

5
 <210> 213
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 213

Ala Ser Ser Gly Leu Asp Asp Leu Asp Leu Leu Gly Lys
 1 5 10

10
 <210> 214
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 214

Val Gln Asn Pro Ser Ala Asp Arg Asn Leu Leu Asp Leu
 1 5 10

20
 <210> 215
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 215

Asn Ala Leu Ser Trp Leu Asp Glu Glu Leu Leu Cys Leu
 1 5 10

25
 <210> 216
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Drosophila sp.
 <400> 216

Thr Val Asp Ser Ile Asp Asp Val Pro Leu Leu Ser Asp
 1 5 10

30
 <210> 217
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 217

Gln Glu Glu Cys Pro Ser Asp Ser Glu Glu Asp Glu Gly
 1 5 10

45
 <210> 218
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 50

ES 2 777 801 T3

<400> 218

Arg Asp Arg Asp Tyr Asp Glu Asp Asp Glu Asp Asp Ile
 1 5 10

5 <210> 219
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 219

Leu Asp Glu Thr Glu Asp Asp Glu Leu Glu Tyr Asp Asp Glu Ser
 1 5 10 15

15 <210> 220
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 220

Lys Asp Pro Asp Glu Val Glu Thr Glu Ser
 1 5 10

25 <210> 221
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 221

His Glu Phe Gln Asp Glu Thr Asp Thr Glu Glu Glu Thr
 1 5 10

30 <210> 222
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 222

Gln Glu Lys Glu Asp Asp Gly Ser Glu Ser Glu Glu Glu Tyr
 1 5 10

40 <210> 223
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 223

Gly Glu Asp Glu Glu Ser Glu Ser Asp
 1 5

50 <210> 224
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 777 801 T3

<400> 224

Gly Glu Asp Ser Asp Glu Glu Pro Asp His Glu Glu
 1 5 10

5

<210> 225
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 225

Leu Glu Asp Asp Ser Asp Glu Glu Glu Asp Phe
 1 5 10

15

<210> 226
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

20

<400> 226

Lys Asp Ser Asp Glu Glu Glu Asn Val
 1 5

25

<210> 227
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Herpesvirus 3

30

<400> 227

Phe Glu Asp Ser Glu Ser Thr Asp Thr Glu Glu Glu Phe
 1 5 10

35

<210> 228
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 228

Leu Glu Ala Gln Glu Glu Glu Glu Val
 1 5

40

<210> 229
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

45

<400> 229

ES 2 777 801 T3

Ala Asp Asp Leu Glu Ser Gly Leu Gly Ala Glu Asp Asp Leu Glu Gln
 1 5 10 15

Asp Glu Gln Leu Glu Gly
 20

5 <210> 230
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 230

Thr Glu Ile Asp Glu Ser Phe Glu Met Thr Asp Phe
 1 5 10

10 <210> 231
 <211> 18
 <212> PRT
 15 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 231

Thr Glu Pro Glu Glu Val Glu Asp Phe Asp Phe Asp Leu Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Asp His

20 <210> 232
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 232

Phe Glu Ile Glu Glu Asp Asp Val Pro Thr Leu Glu Glu Glu His
 1 5 10 15

30 <210> 233
 <211> 707
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 233

Lys Ile Tyr Asp Leu His Lys Lys Arg Ser Cys Asn Leu Asp Glu Gln
 1 5 10 15

Gln Glu Leu Val Glu Arg Asp Asp Glu Lys Gln Leu Met Asn Val Glu
 20 25 30

ES 2 777 801 T3

Pro Ile His Ala Asp Ile Leu Leu Glu Thr Tyr Lys Arg Lys Ile Ala
 35 40 45

Asp Glu Gly Arg Leu Phe Leu Ala Glu Phe Gln Ser Ile Pro Arg Val
 50 55 60

Phe Ser Lys Phe Pro Ile Lys Glu Ala Arg Lys Pro Phe Asn Gln Asn
 65 70 75 80

Lys Asn Arg Tyr Val Asp Ile Leu Pro Tyr Asp Tyr Asn Arg Val Glu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ile Asn Gly Asp Ala Gly Ser Asn Tyr Ile Asn Ala Ser
 100 105 110

Tyr Ile Asp Gly Phe Lys Glu Pro Arg Lys Tyr Ile Ala Ala Gln Gly
 115 120 125

Pro Arg Asp Glu Thr Val Asp Asp Phe Trp Arg Met Ile Trp Glu Gln
 130 135 140

Lys Ala Thr Val Ile Val Met Val Thr Arg Cys Glu Glu Gly Asn Arg
 145 150 155 160

Asn Lys Cys Ala Glu Tyr Trp Pro Ser Met Glu Glu Gly Thr Arg Ala
 165 170 175

Phe Gly Asp Val Val Val Lys Ile Asn Gln His Lys Arg Cys Pro Asp
 180 185 190

Tyr Ile Ile Gln Lys Leu Asn Ile Val Asn Lys Lys Glu Lys Ala Thr
 195 200 205

Gly Arg Glu Val Thr His Ile Gln Phe Thr Ser Trp Pro Asp His Gly
 210 215 220

Val Pro Glu Asp Pro His Leu Leu Leu Lys Leu Arg Arg Arg Val Asn
 225 230 235 240

Ala Phe Ser Asn Phe Phe Ser Gly Pro Ile Val Val His Cys Ser Ala
 245 250 255

Gly Val Gly Arg Thr Gly Thr Tyr Ile Gly Ile Asp Ala Met Leu Glu
 260 265 270

Gly Leu Glu Ala Glu Asn Lys Val Asp Val Tyr Gly Tyr Val Val Lys
 275 280 285

ES 2 777 801 T3

Leu Arg Arg Gln Arg Cys Leu Met Val Gln Val Glu Ala Gln Tyr Ile
 290 295 300

Leu Ile His Gln Ala Leu Val Glu Tyr Asn Gln Phe Gly Glu Thr Glu
 305 310 315 320

Val Asn Leu Ser Glu Leu His Pro Tyr Leu His Asn Met Lys Lys Arg
 325 330 335

Asp Pro Pro Ser Glu Pro Ser Pro Leu Glu Ala Glu Phe Gln Arg Leu
 340 345 350

Pro Ser Tyr Arg Ser Trp Arg Thr Gln His Ile Gly Asn Gln Glu Glu
 355 360 365

Asn Lys Ser Lys Asn Arg Asn Ser Asn Val Ile Pro Tyr Asp Tyr Asn
 370 375 380

Arg Val Pro Leu Lys His Glu Leu Glu Met Ser Lys Glu Ser Glu His
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Glu Ser Ser Asp Asp Asp Ser Asp Ser Glu Glu Pro Ser
 405 410 415

Lys Tyr Ile Asn Ala Ser Phe Ile Met Ser Tyr Trp Lys Pro Glu Val
 420 425 430

Met Ile Ala Ala Gln Gly Pro Leu Lys Glu Thr Ile Gly Asp Phe Trp
 435 440 445

Gln Met Ile Phe Gln Arg Lys Val Lys Val Ile Val Met Leu Thr Glu
 450 455 460

Leu Lys His Gly Asp Gln Glu Ile Cys Ala Gln Tyr Trp Gly Glu Gly
 465 470 475 480

Lys Gln Thr Tyr Gly Asp Ile Glu Val Asp Leu Lys Asp Thr Asp Lys
 485 490 495

Ser Ser Thr Tyr Thr Leu Arg Val Phe Glu Leu Arg His Ser Lys Arg
 500 505 510

Lys Asp Ser Arg Thr Val Tyr Gln Tyr Gln Tyr Thr Asn Trp Ser Val
 515 520 525

Glu Gln Leu Pro Ala Glu Pro Lys Glu Leu Ile Ser Met Ile Gln Val
 530 535 540

ES 2 777 801 T3

Val Lys Gln Lys Leu Pro Gln Lys Asn Ser Ser Glu Gly Asn Lys His
545 550 555 560

His Lys Ser Thr Pro Leu Leu Ile His Cys Arg Asp Gly Ser Gln Gln
565 570 575

Thr Gly Ile Phe Cys Ala Leu Leu Asn Leu Leu Glu Ser Ala Glu Thr
580 585 590

Glu Glu Val Val Asp Ile Phe Gln Val Val Lys Ala Leu Arg Lys Ala
595 600 605

Arg Pro Gly Met Val Ser Thr Phe Glu Gln Tyr Gln Phe Leu Tyr Asp
610 615 620

Val Ile Ala Ser Thr Tyr Pro Ala Gln Asn Gly Gln Val Lys Lys Asn
625 630 635 640

Asn His Gln Glu Asp Lys Ile Glu Phe Asp Asn Glu Val Asp Lys Val
645 650 655

Lys Gln Asp Ala Asn Cys Val Asn Pro Leu Gly Ala Pro Glu Lys Leu
660 665 670

Pro Glu Ala Lys Glu Gln Ala Glu Gly Ser Glu Pro Thr Ser Gly Thr
675 680 685

Glu Gly Pro Glu His Ser Val Asn Gly Pro Ala Ser Pro Ala Leu Asn
690 695 700

Gln Gly Ser
705

5 <210> 234
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sitio de escisión
<400> 234

Asp Ile Glu Thr Asn Pro Gly Pro
1 5

15 <210> 235
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> sitio de escisión
<400> 235

ES 2 777 801 T3

Asp Val Glu Thr Asn Pro Gly Pro
1 5

5 <210> 236
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sitio de escisión

<400> 236

Asp Val Glu Met Asn Pro Gly Pro
1 5

15 <210> 237
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> sitio de escisión

<400> 237

25

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
1 5

30 <210> 238
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Péptido señal del ER

<400> 238

Lys Lys Phe Phe
1

40 <210> 239
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> señal de retención intracelular

<400> 239

His Asp Glu Leu
1

50

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de ácido nucleico que comprende la siguiente estructura:

5 A-X-B

en la cual

10 X es una secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio de escisión; y
 A y B son secuencias de ácido nucleico que codifican un primer y un segundo receptor de antígeno quimérico (CAR), comprendiendo cada CAR:

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

20 en el que los dominios de unión a antígeno del primer y segundo CAR se unen a diferentes antígenos, en el que el espaciador del primer CAR tiene un tamaño diferente al del espaciador del segundo CAR de modo que cuando el primer CAR y el segundo CAR se unen a sus respectivos antígenos diana en la superficie celular, el primer CAR y el segundo CAR quedan espacialmente separados en la membrana celular; en el que uno del primer o segundo CAR es un CAR activador que comprende un endodominio activador y el otro CAR es un CAR inhibidor que comprende un endodominio inhibidor en ausencia de ligadura, CAR inhibidor que inhibe la activación de los linfocitos T por el CAR activador en ausencia de ligadura por el CAR inhibidor, pero no inhibe significativamente la activación de linfocitos T por el CAR activador cuando el CAR inhibidor está ligado; y en el que:

- 25 (a) el primero y/o segundo CAR comprende una señal de retención intracelular; y/o
- (b) el péptido de señal del primer o segundo CAR comprende una o más mutaciones de manera que tiene menos aminoácidos hidrófobos.

30 2. Una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que el primero y/o segundo CAR comprende una señal de retención intracelular que dirige el CAR a un compartimento lisosomal, endosomal o del aparato de Golgi.

35 3. Una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que el primero y/o segundo CAR comprende una señal de retención intracelular seleccionada del siguiente grupo: una señal de endocitosis; una señal de retención en el aparato de Golgi; una señal de reciclaje en la red trans-Golgi (TGN); una señal de retención en el retículo endoplásmico (ER); y una señal de clasificación lisosomal.

40 4. Una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que el péptido de señal del primero o segundo CAR comprende una o más mutaciones de tal modo que tiene menos aminoácidos hidrófobos que a) su secuencia de tipo silvestre o b) el péptido de señal del otro CAR.

45 5. Una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 4, en la que el péptido de señal del CAR activador comprende una o más mutaciones de tal modo que tiene menos aminoácidos hidrófobos, de tal modo que cuando la construcción de ácido nucleico se expresa en una célula, el nivel de expresión relativa del CAR activador en la superficie celular está reducido en comparación con el CAR inhibidor.

50 6. Una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 4, en la que el o los aminoácidos hidrófobos eliminados o sustituidos por mutación se seleccionan del grupo: Alanina (A); Valina (V); Isoleucina (I); Leucina (L); Metionina (M); Fenilalanina (P); Tirosina (Y); Triptófano (W).

7. Una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 4, en la que el o los aminoácidos hidrófobos eliminados o sustituidos por mutación se seleccionan del grupo: Valina (V); Isoleucina (I); Leucina (L); y triptófano (W).

55 8. Una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que el péptido de señal del primero y segundo CAR difieren en su número de aminoácidos hidrófobos y en la que un péptido de señal comprende hasta cinco aminoácidos hidrófobos más que el otro péptido de señal.

60 9. Un vector que comprende una construcción de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

10. Una célula que comprende una construcción de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un vector según la reivindicación 9.

65 11. Un método para fabricar una célula según la reivindicación 10, que comprende la etapa de introducir: una construcción de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un vector según la reivindicación 9, en una célula *ex vivo*.

12. Una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de células según la reivindicación 10.

5 13. Una composición farmacéutica según la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de una enfermedad.

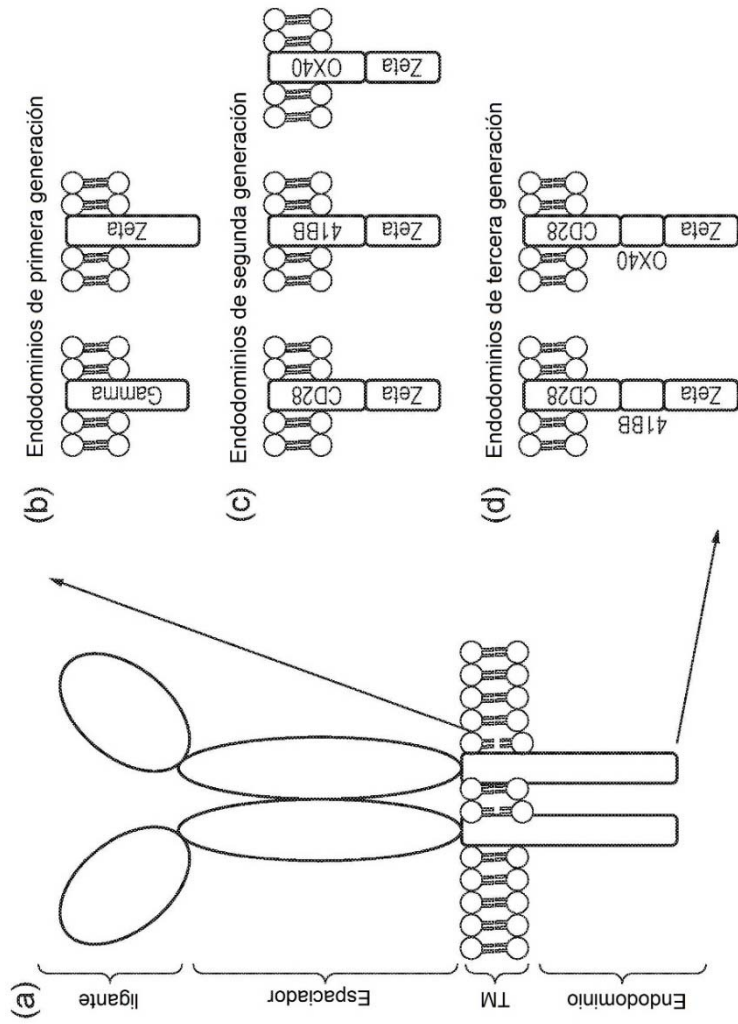


FIG. 1

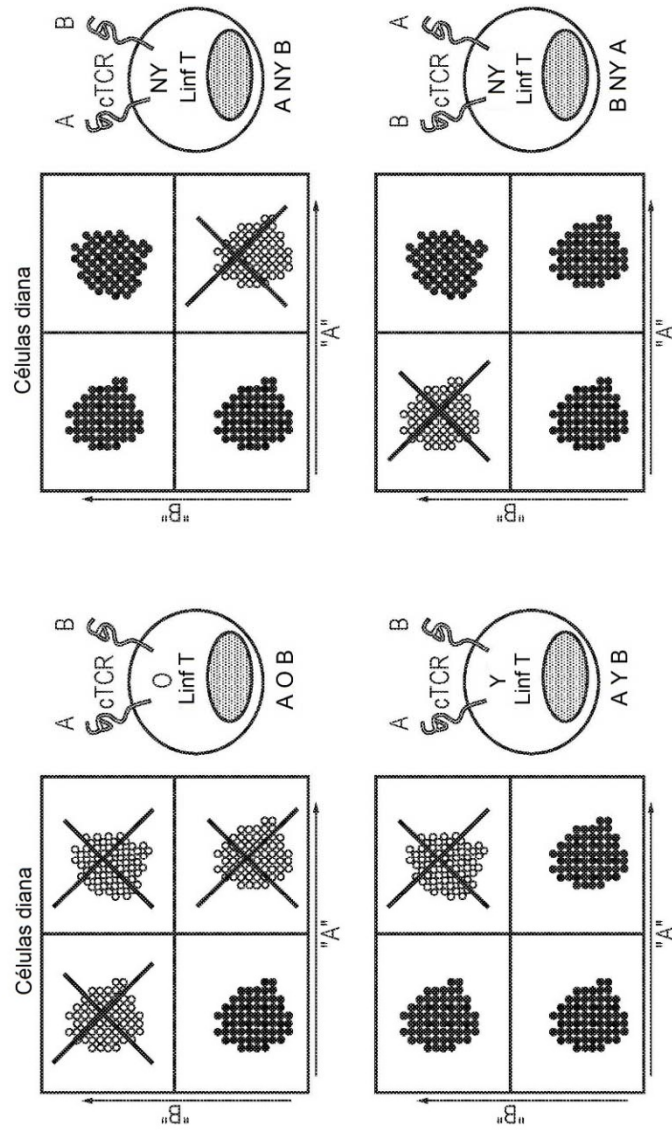


FIG. 2

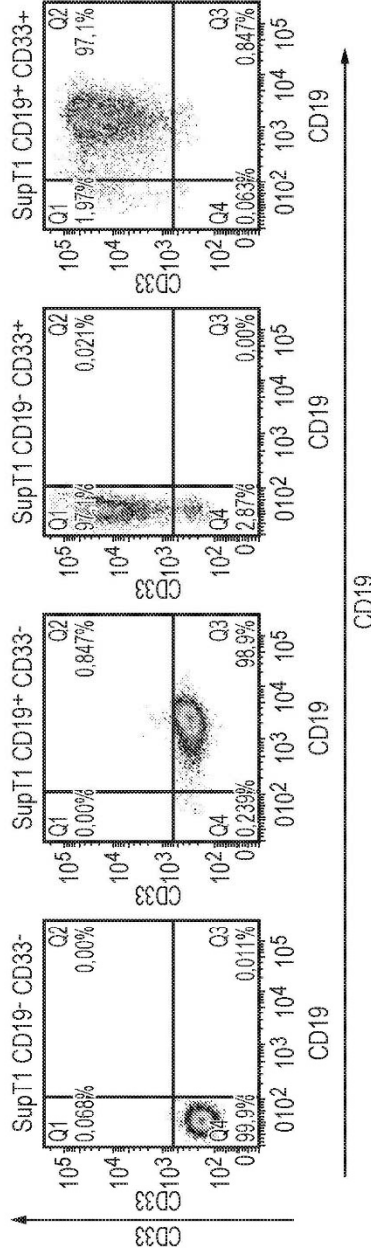


FIG. 3

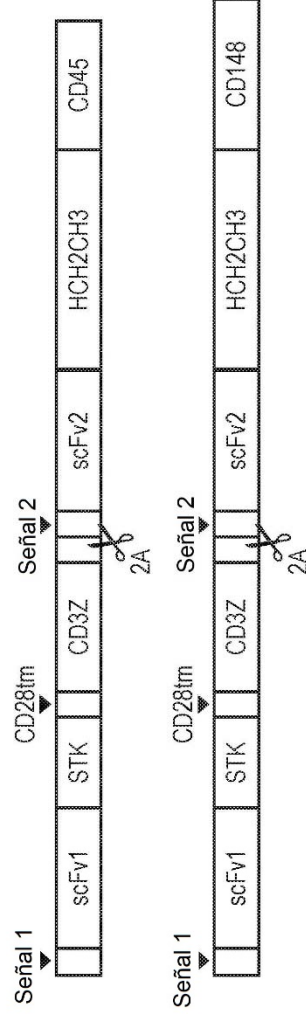


FIG. 4

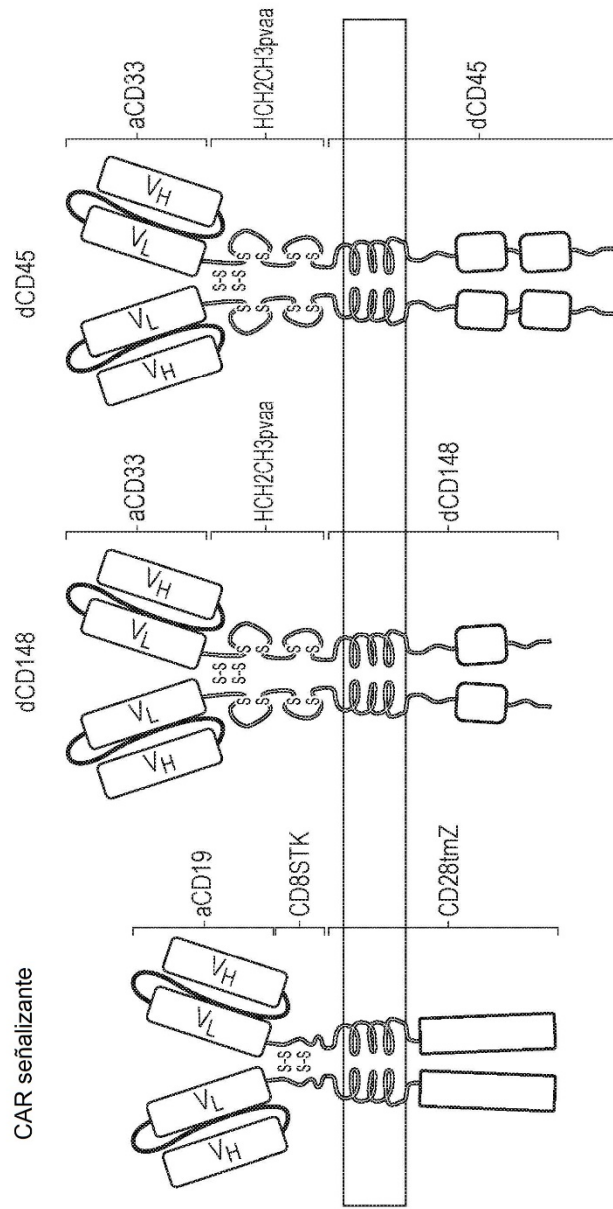


FIG. 5

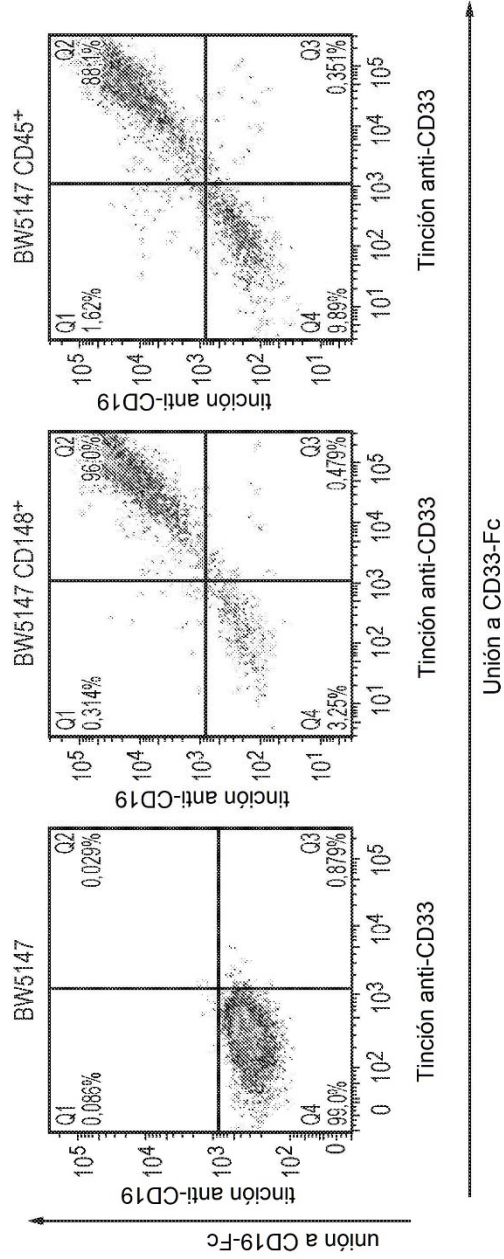


FIG. 6

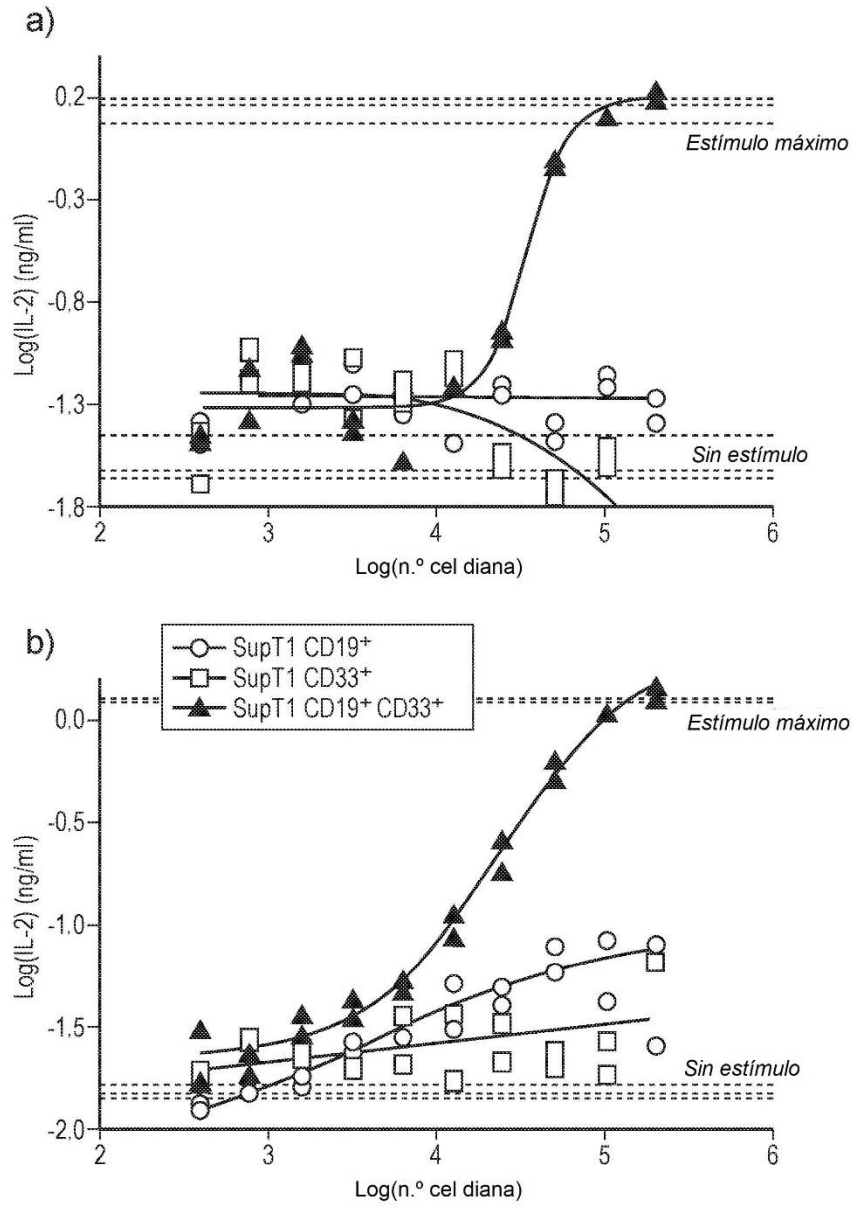


FIG. 7

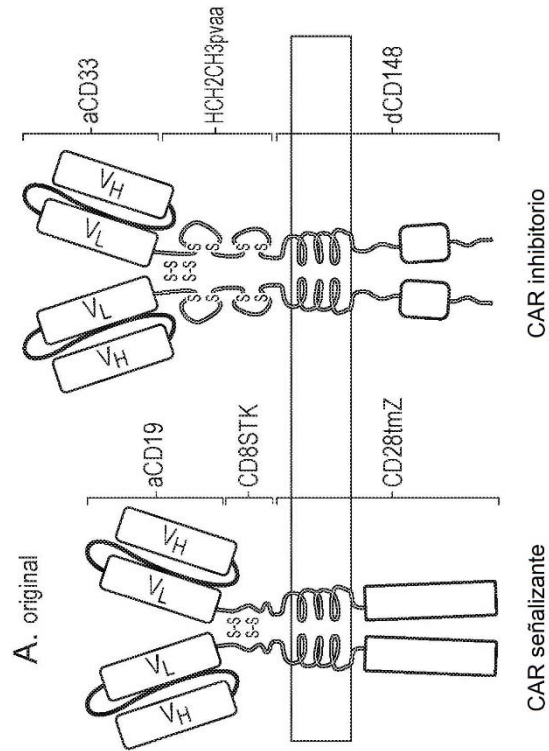
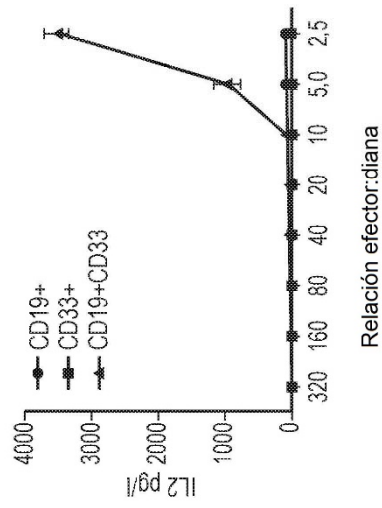


FIG. 8



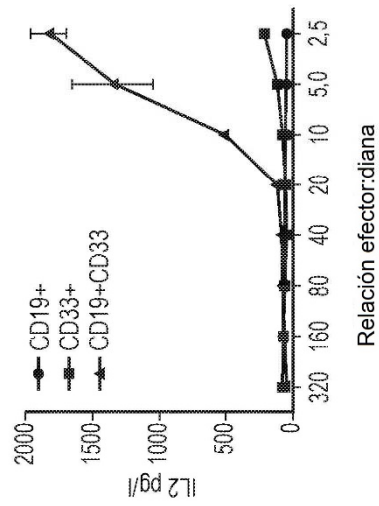
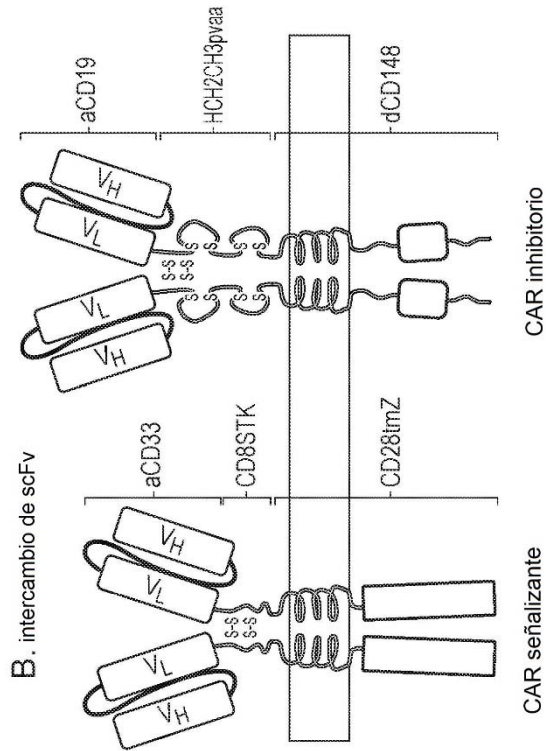


FIG. 8 (Continuación)

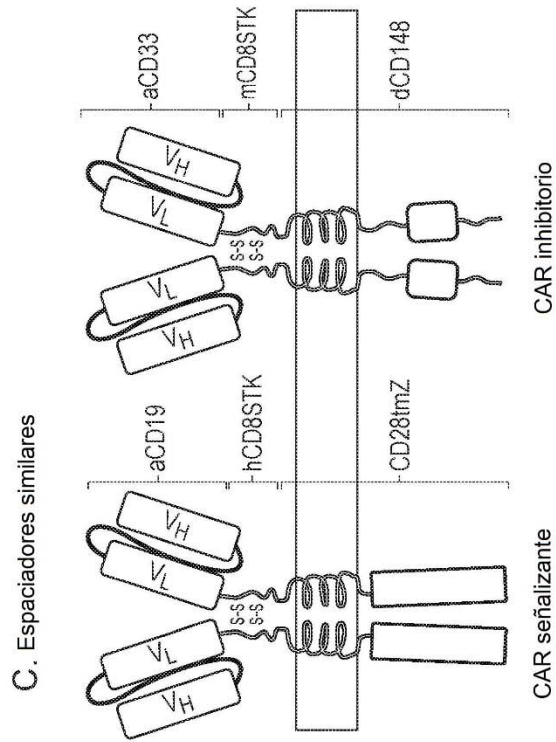
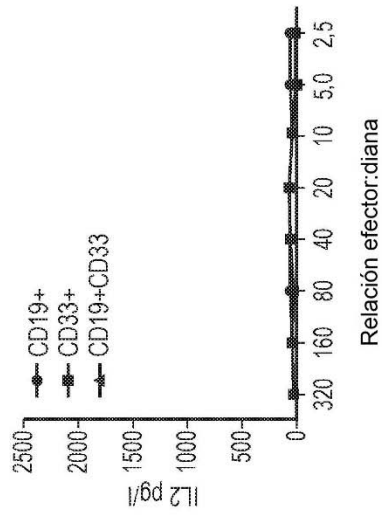


FIG. 8 (Continuación)



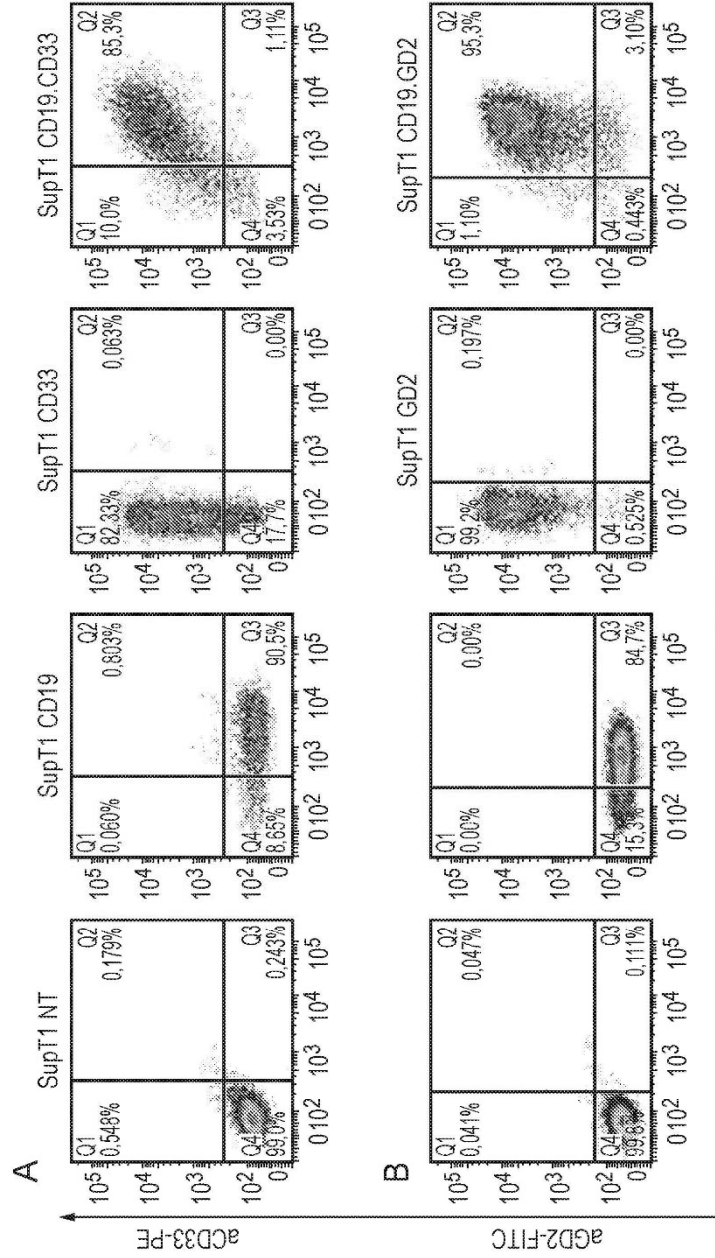


FIG. 9

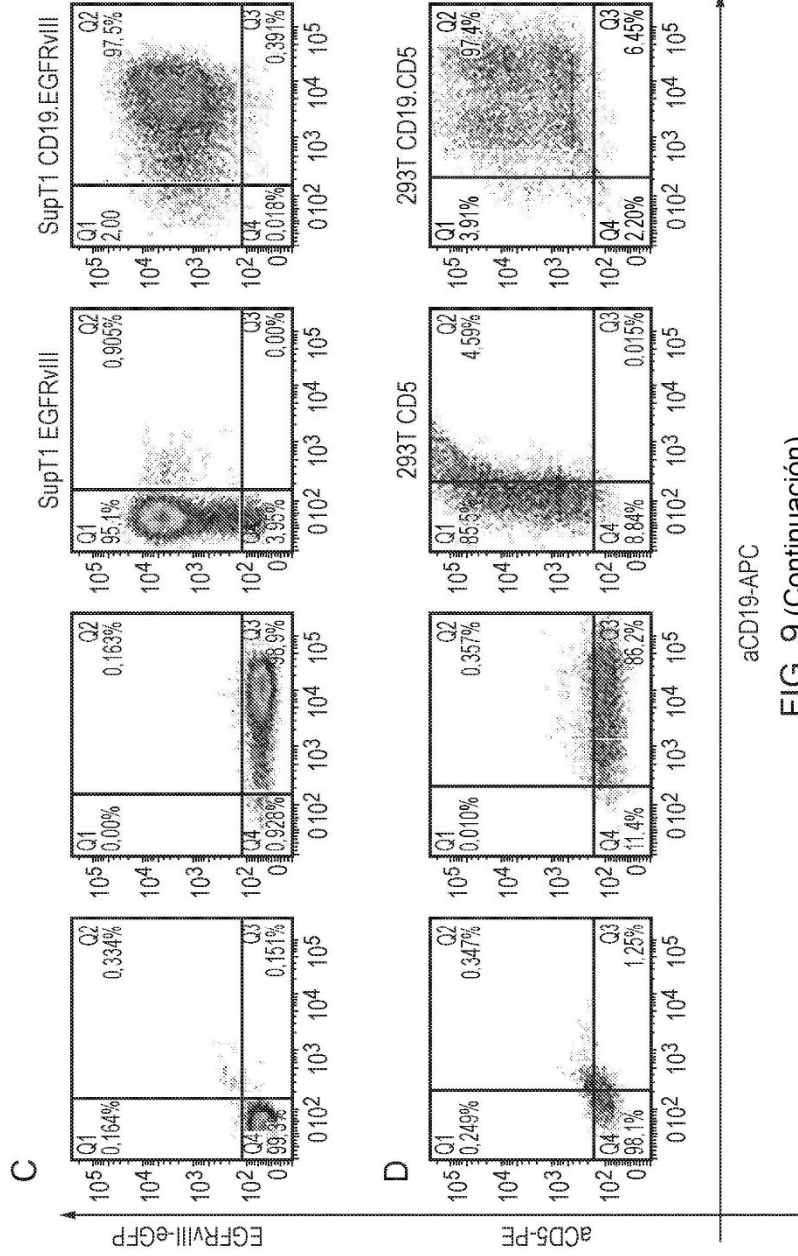


FIG. 9 (Continuación)

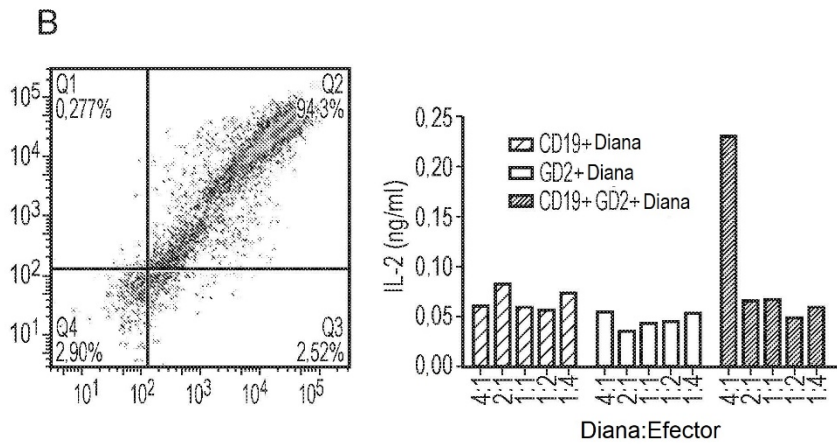
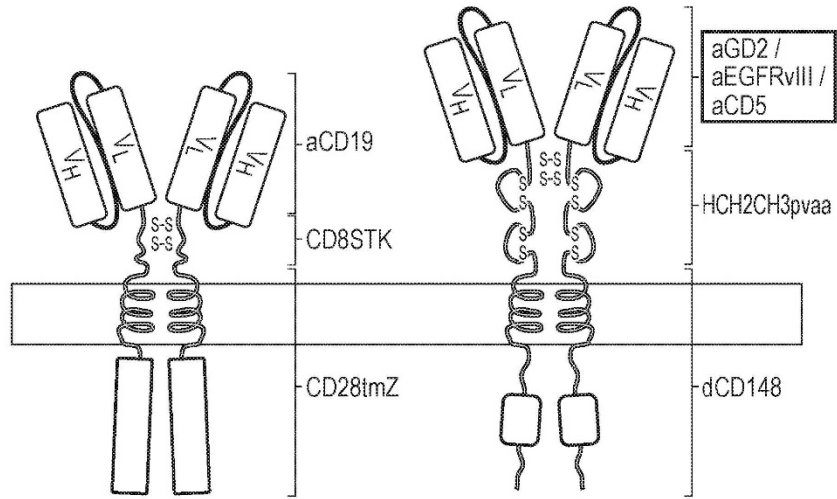


FIG. 10

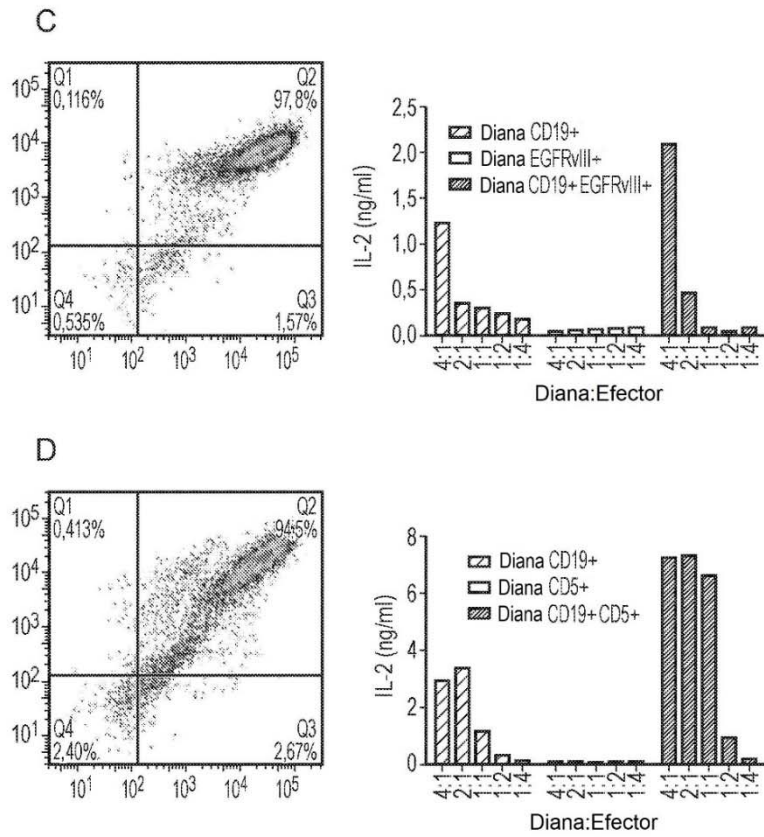


FIG. 10 (Continuación)

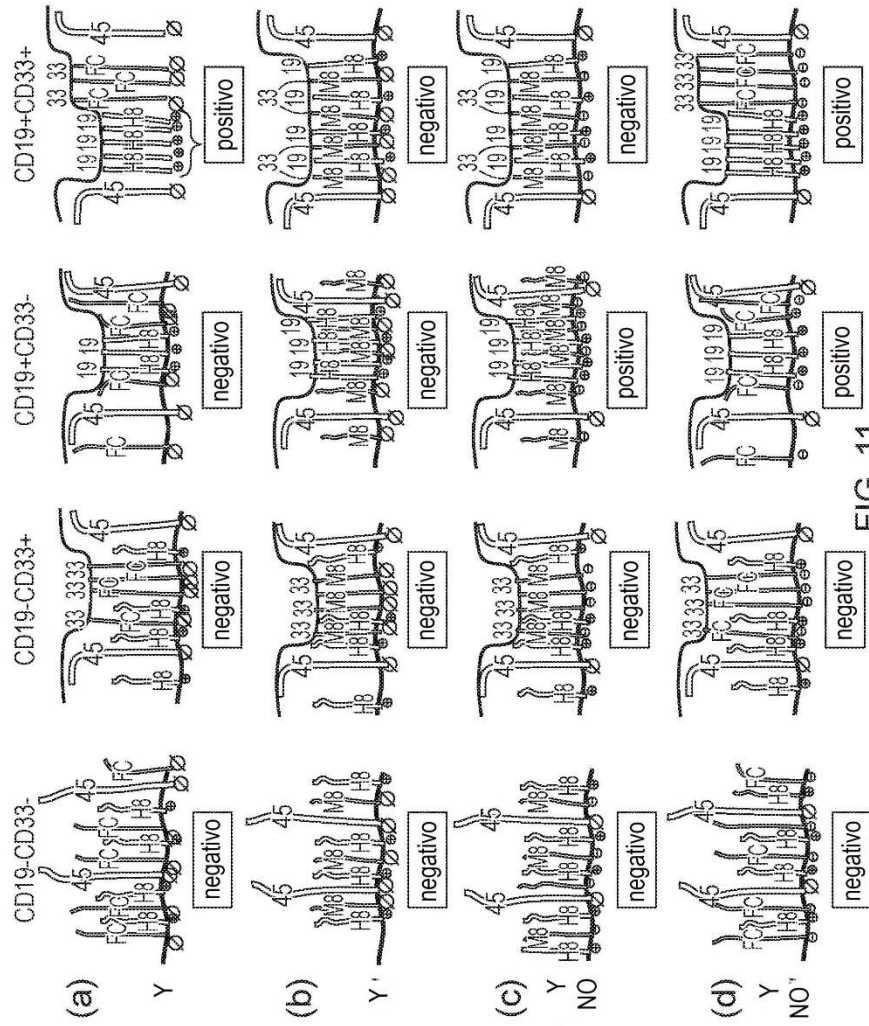


FIG. 11

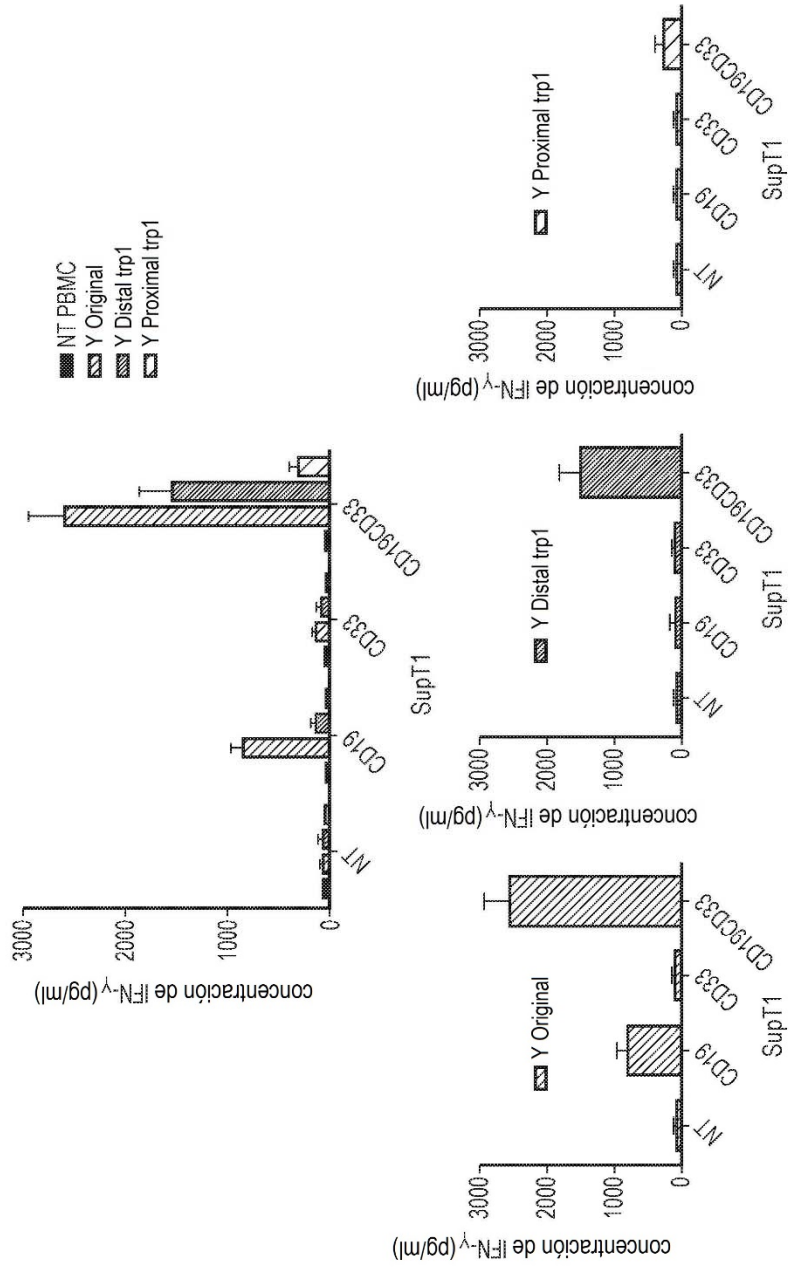


FIG. 12

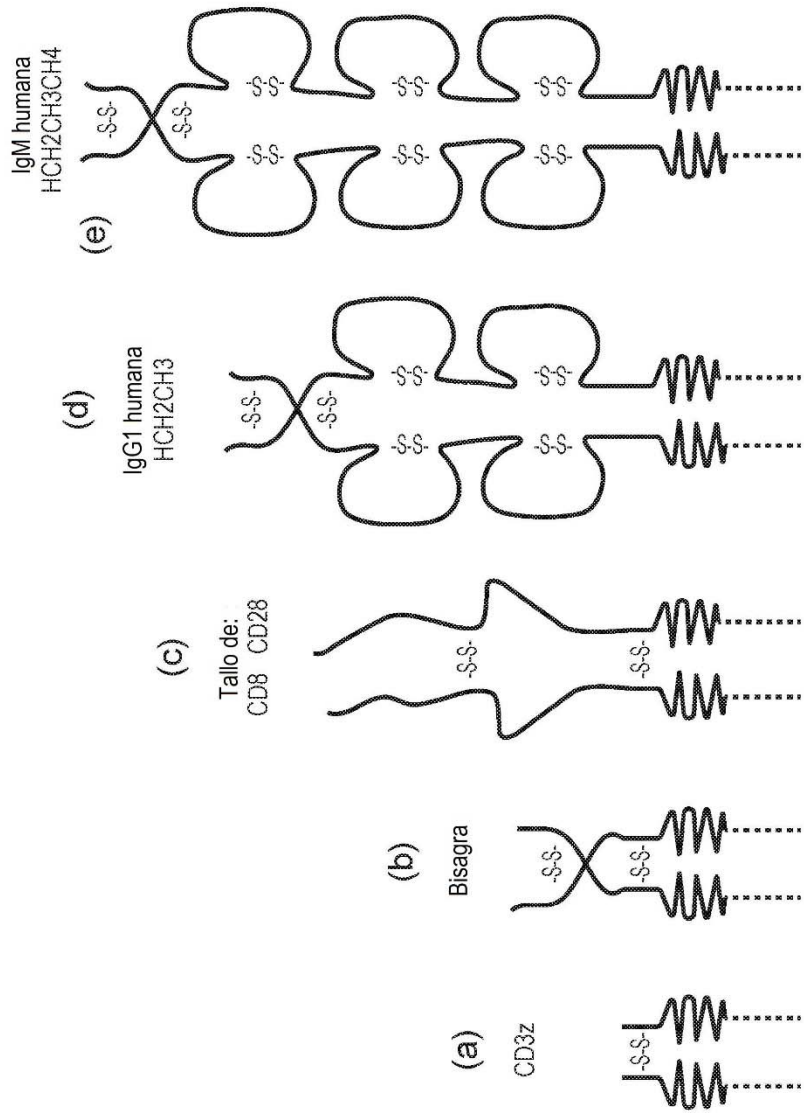


FIG. 13

		aCD33-(espaciador)-dCD148				
		Bisagra	huCD8STK	huCD28STK	hulgG-Fc	hulgM-Fc
aCD19-(espaciador)-CD28trmZ	Bisagra	SIN ESTIM	?	?	Y	Y
	huCD8STK	?	SIN ESTIM	SIN ESTIM	Y	Y
	huCD28STK	?	SIN ESTIM	SIN ESTIM	Y	Y
	hulgG-Fc	?	Y	?	SIN ESTIM	SIN ESTIM
	hulgM-Fc	?	?	?	?	SIN ESTIM

FIG. 14

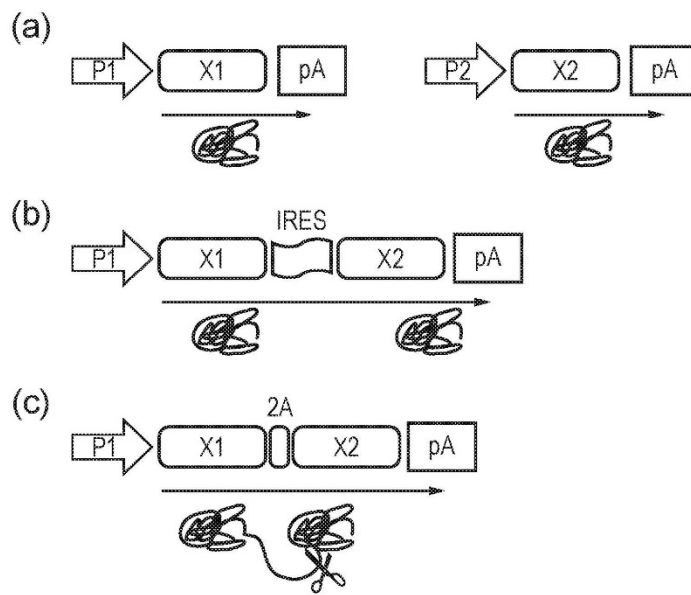


FIG. 15

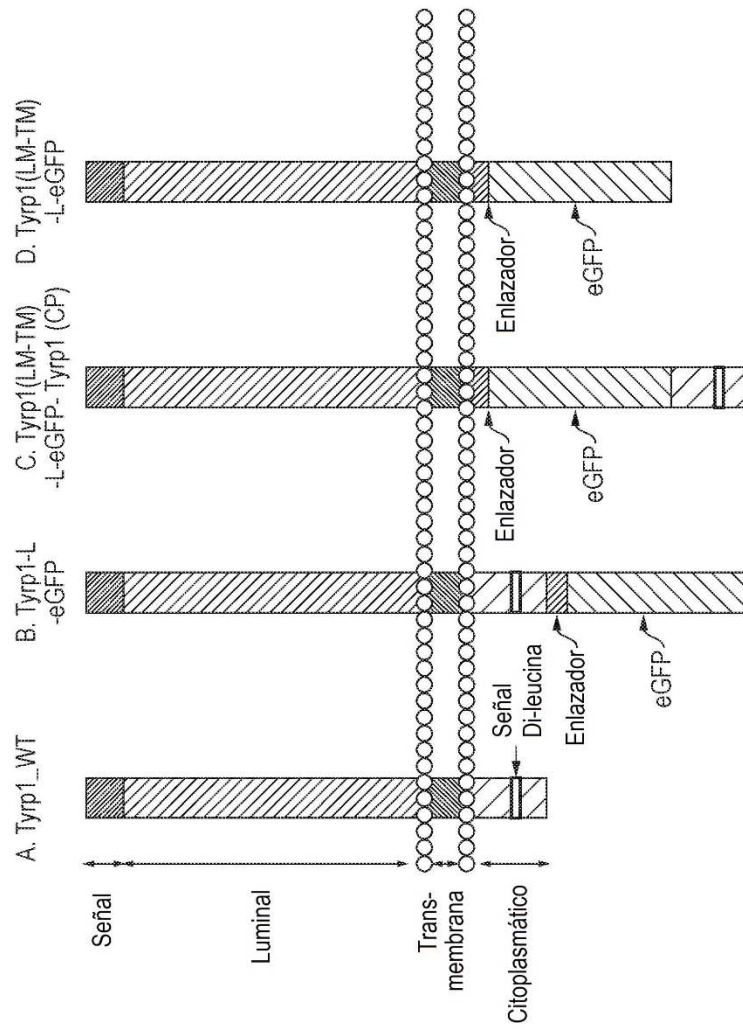


FIG. 16

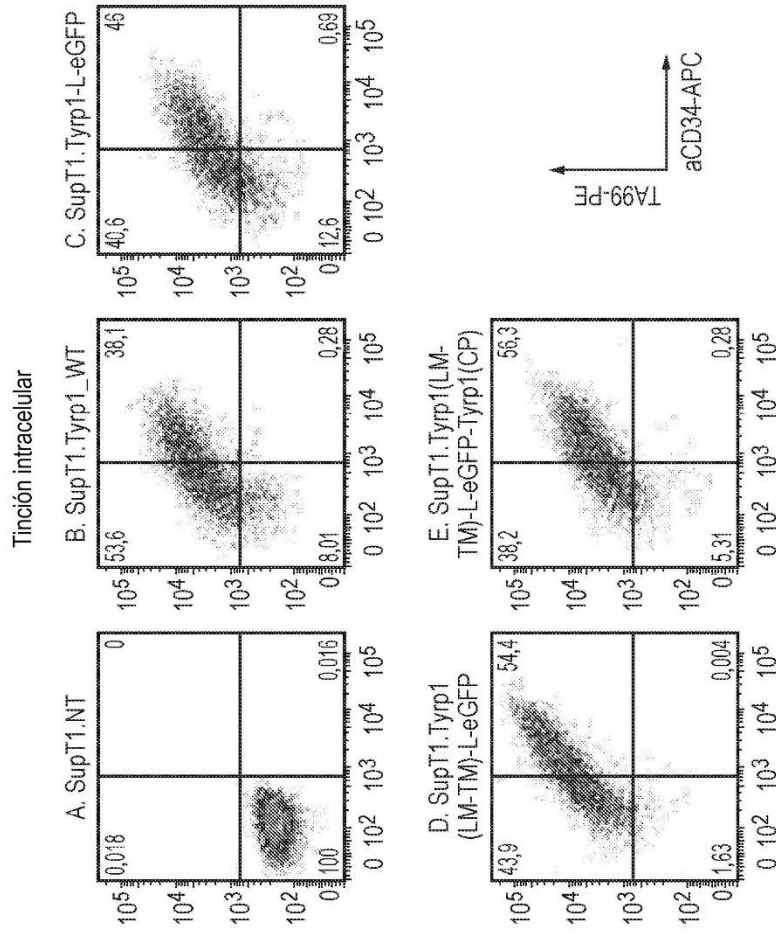


FIG. 16 (Continuación)

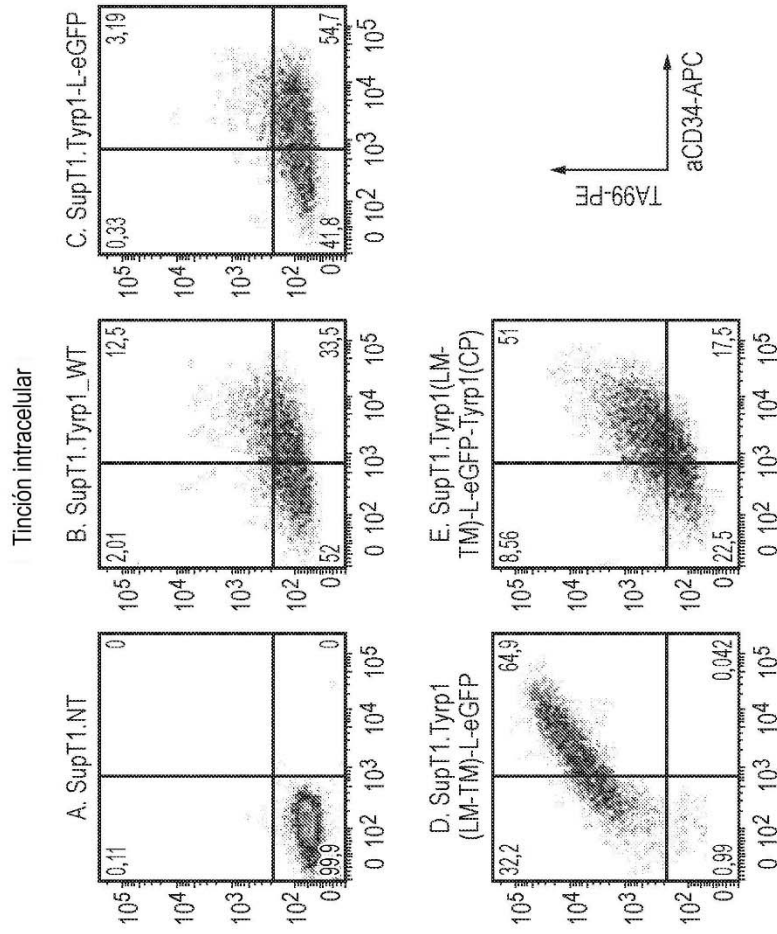


FIG. 16 (Continuación)

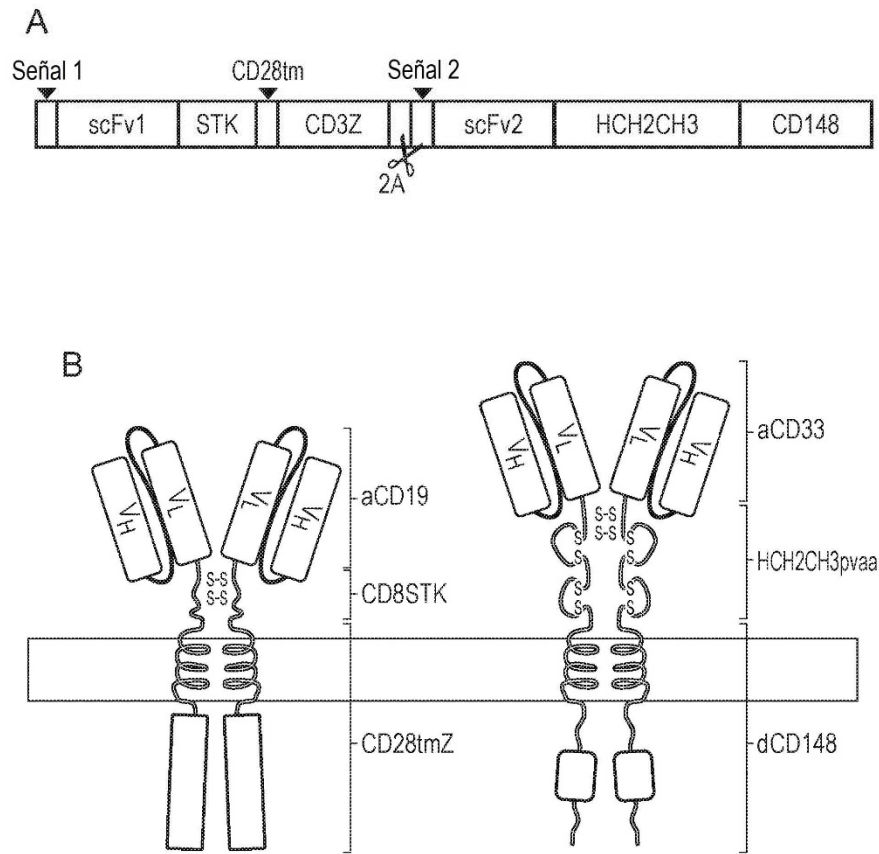


FIG. 17

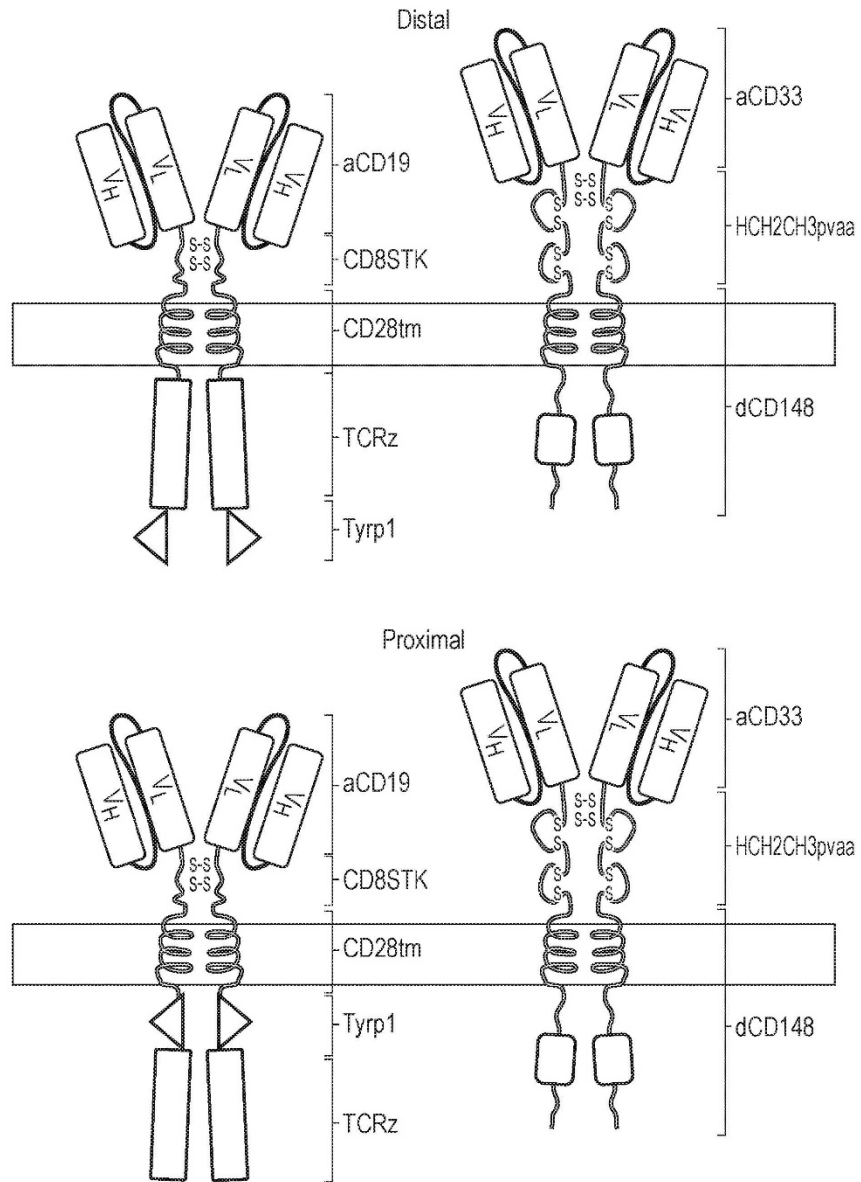


FIG. 17 (Continuación)

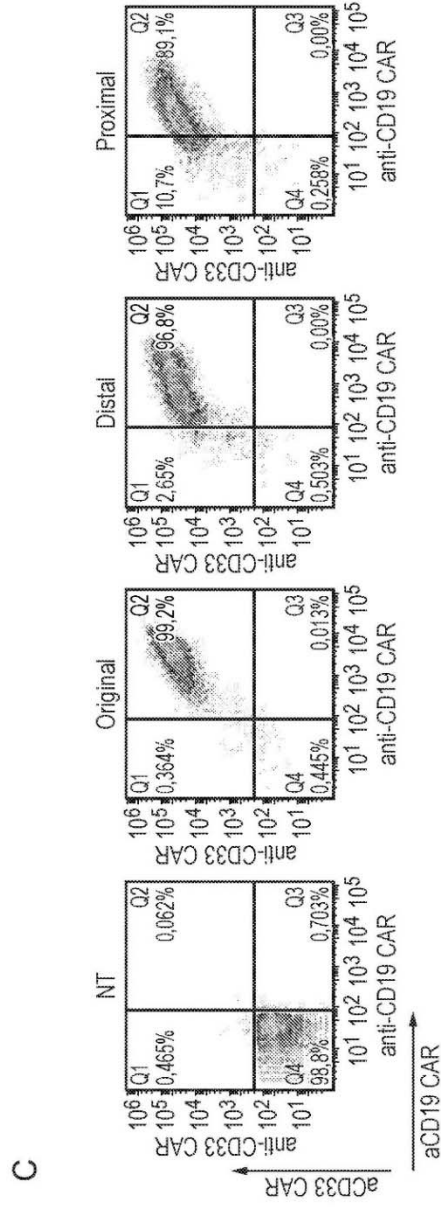


FIG. 17 (Continuación)

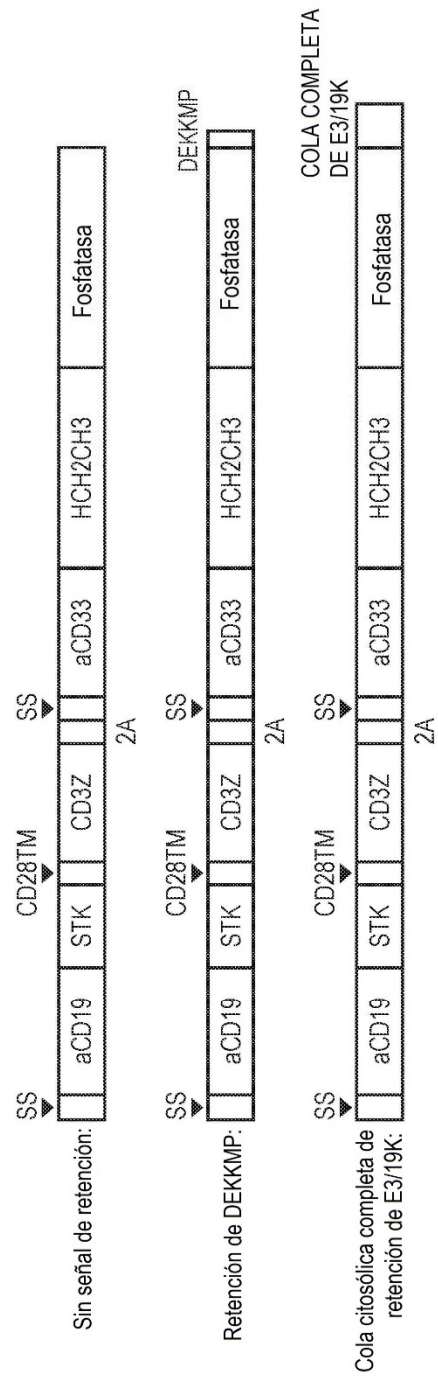


FIG. 18

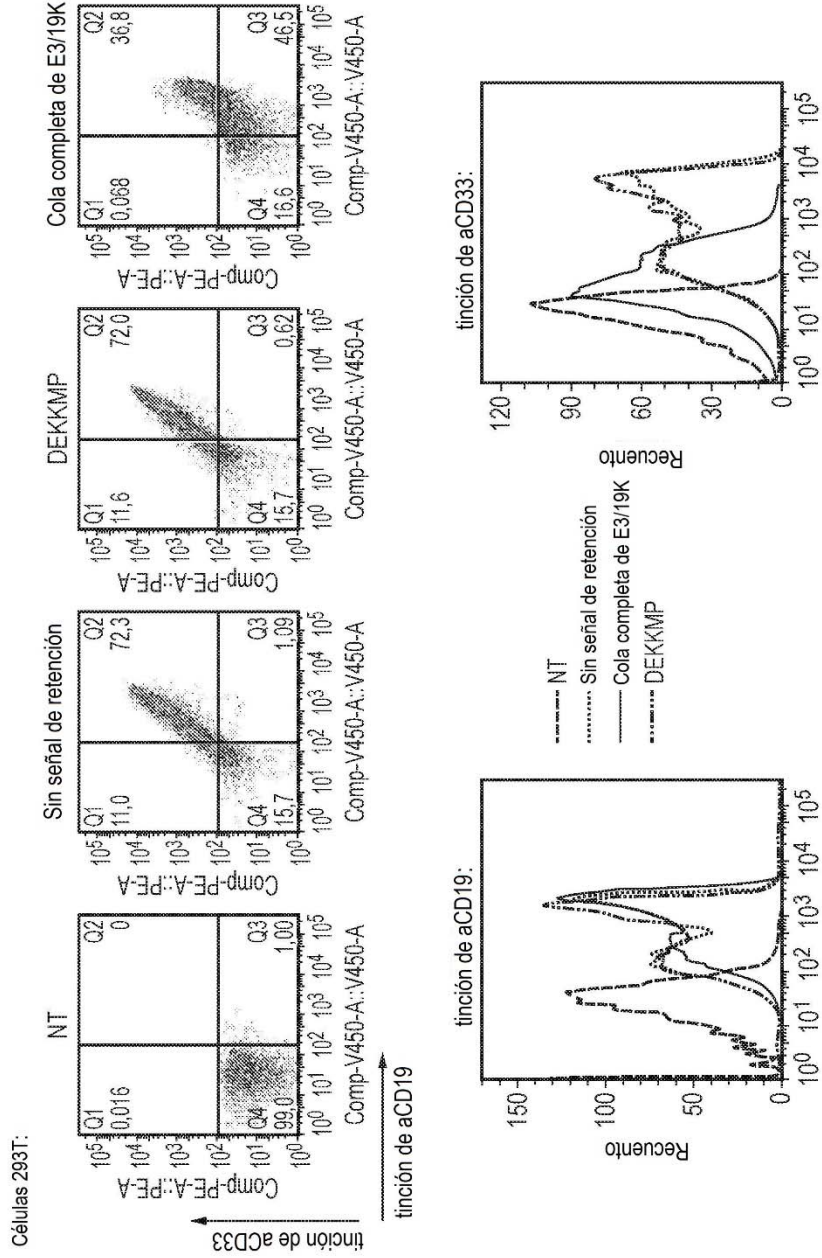


FIG. 19

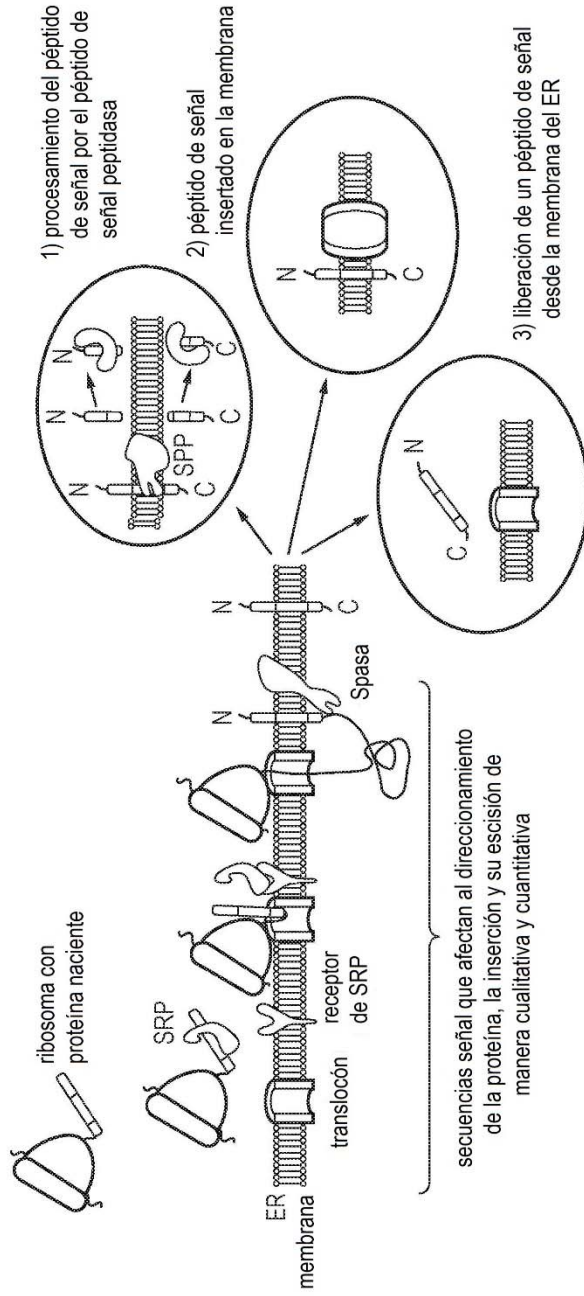


FIG. 20

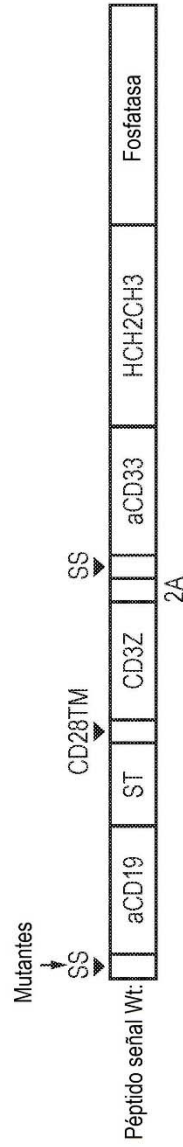


FIG. 21

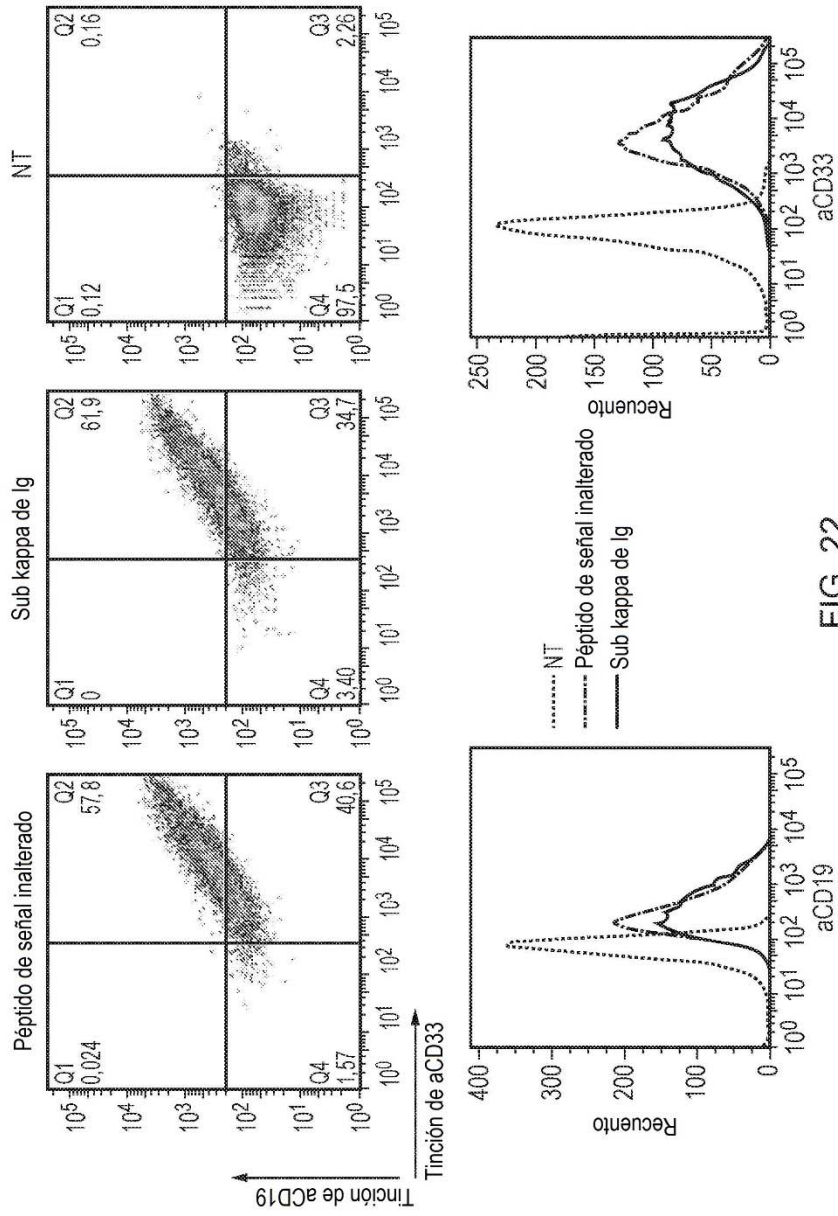


FIG. 22

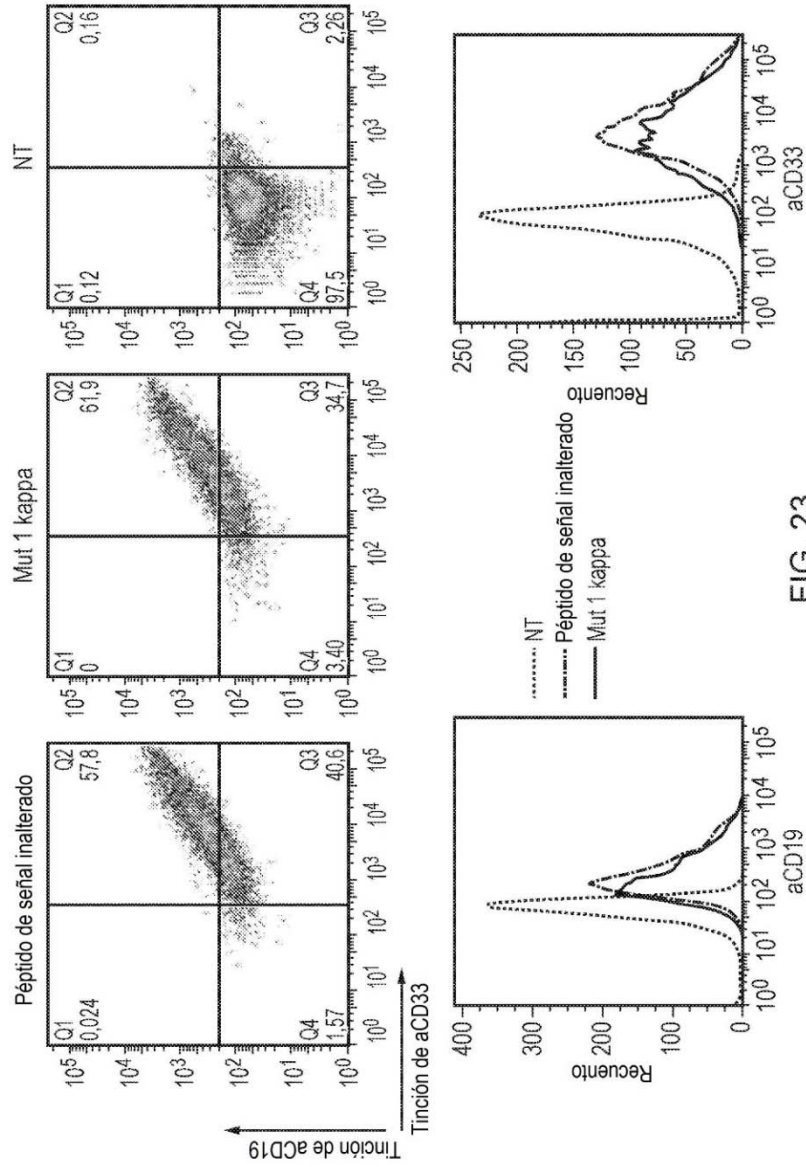


FIG. 23

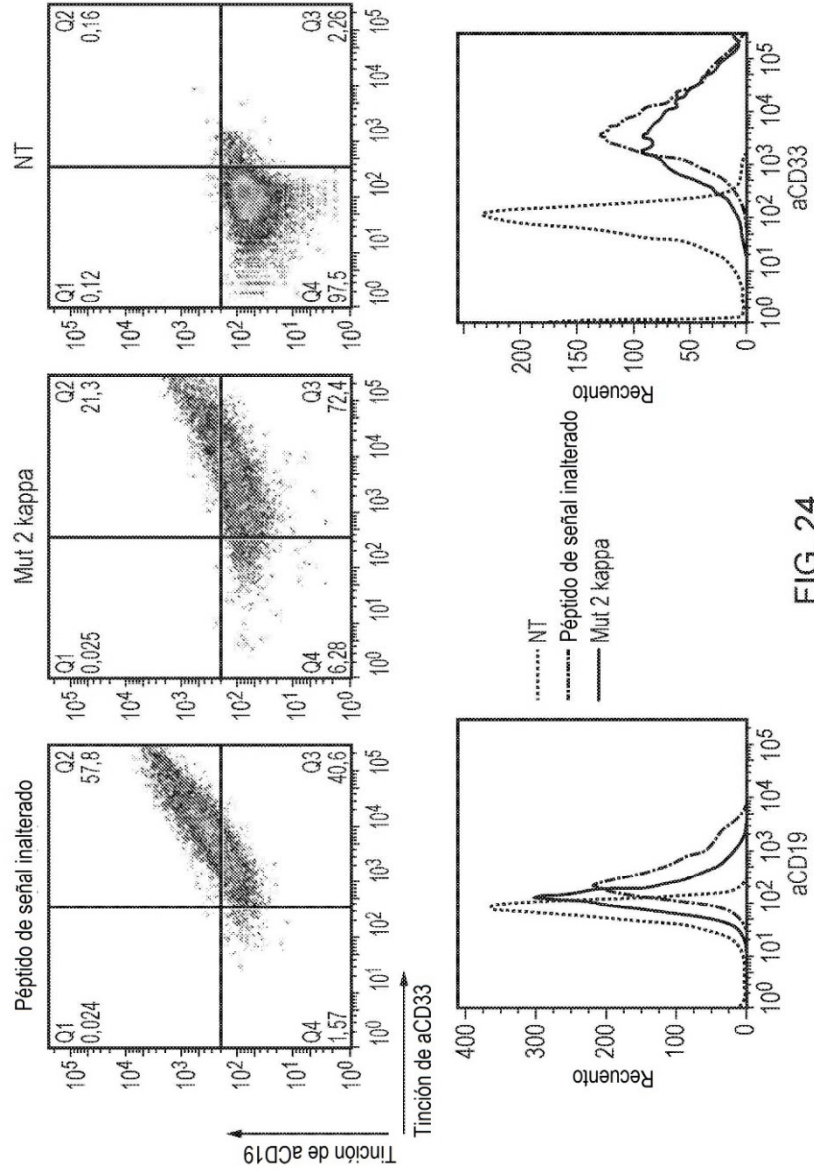


FIG. 24

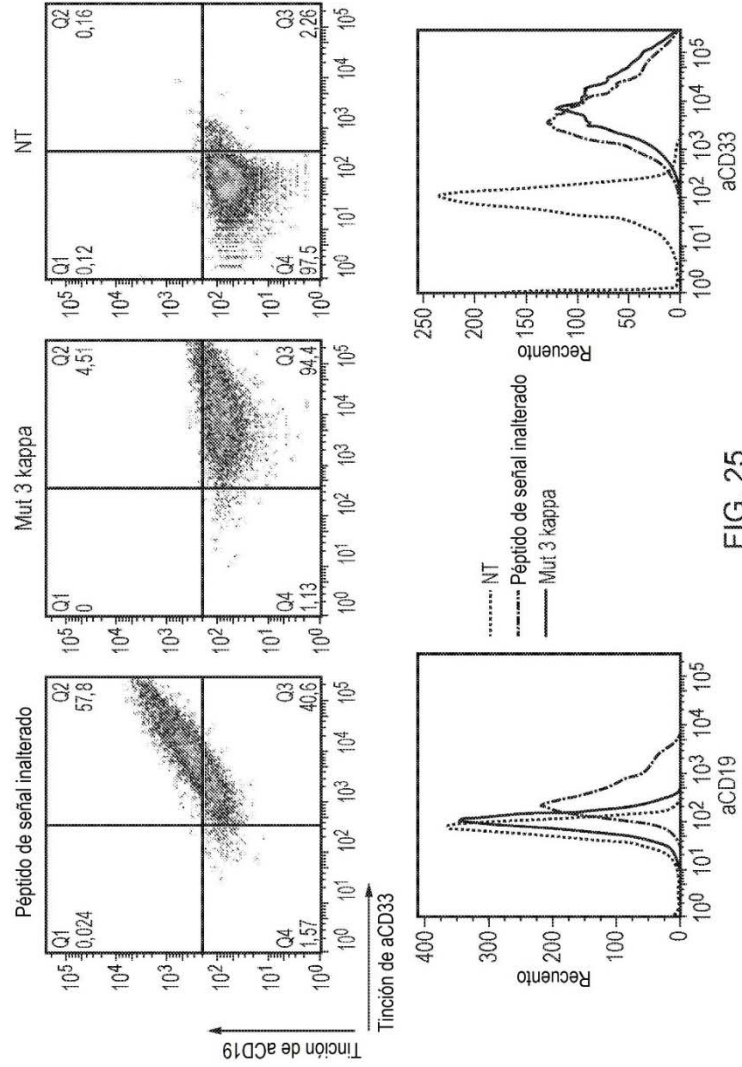


FIG. 25

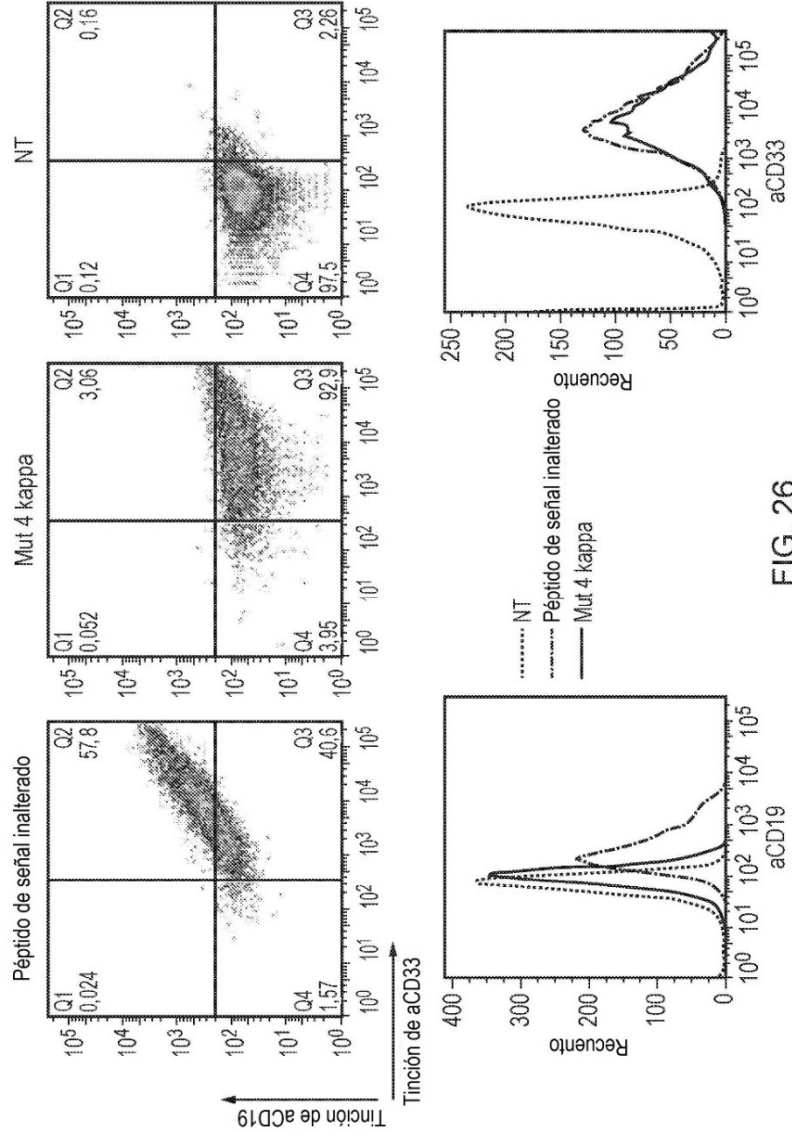


FIG. 26