(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 778 905**

(51) Int. CI.:

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/GB2016/051161**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16174405**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2016 E 16721210 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3288969**

(54) Título: **Constructo de ácido nucleico para la expresión de más de un receptor de antígeno quimérico**

(30) Prioridad:

27.04.2015 GB 201507111

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.08.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

PULÉ, MARTIN y
CORDOBA, SHAUN

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

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

Campo de la invención

La presente invención se refiere a constructos y enfoques para expresar más de un receptor de antígeno quimérico (CAR) en la superficie de una célula. La célula puede ser capaz de reconocer específicamente una célula objetivo, debido a un patrón diferencial de expresión (o no expresión) de dos o más antígenos por parte de la célula objetivo. Los constructos de la invención permiten la modulación de la expresión relativa de los dos o más CAR en la superficie celular mediante un método que implica la coexpresión de los CAR a partir de un único vector.

Antecedentes de la invención

Se han descrito varios agentes inmunoterapéuticos para su uso en el tratamiento del cáncer, que incluyen anticuerpos monoclonales terapéuticos (mAb), mAb inmunoconjugados, mAb radioconjugados y activadores de células T biespecíficas.

Típicamente, estos agentes inmunoterapéuticos se unen a un único antígeno: por ejemplo, Rituximab se une a CD20; Myelotarg se une a CD33; y Alemtuzumab se une a CD52.

Sin embargo, es relativamente raro que la presencia (o ausencia) de un solo antígeno describa eficazmente un cáncer.

La hipótesis de Goldie-Coldman proporciona un problema particular en el campo de la oncología: que describe que el único objetivo de un solo antígeno puede dar como resultado la fuga del tumor mediante la modulación de dicho antígeno debido a la alta tasa de mutación inherente en la mayoría de los cánceres. Esta modulación de la expresión del antígeno puede reducir la eficacia de los compuestos inmunoterapéuticos conocidos.

La heterogeneidad tumoral describe la observación de que diferentes células tumorales pueden mostrar distintos perfiles morfológicos y fenotípicos, que incluyen morfología celular, expresión génica, metabolismo, proliferación y potencial metastásico. Este fenómeno ocurre tanto entre tumores como dentro de los tumores. Se ha observado heterogeneidad tumoral en leucemias, cánceres de mama, próstata, colon, cerebro, cabeza y cuello, vejiga y ginecológicos, por ejemplo. La heterogeneidad tumoral puede dar como resultado la expresión de diferentes antígenos en la superficie de las células dentro de un tumor o entre tumores. Esta heterogeneidad de las células cancerosas presenta desafíos importantes en el diseño de estrategias de tratamiento efectivas.

Por lo tanto, existe la necesidad de agentes inmunoterapéuticos que sean capaces de unirse a más de un antígeno para reflejar el patrón complejo de la expresión del marcador que está asociada con muchos cánceres.

Receptores de antígeno quimérico (CAR)

Los receptores de antígeno quimérico son proteínas que injertan la especificidad de un anticuerpo monoclonal (mAb) para la función efectora de una célula T. Su forma habitual es la de una proteína de dominio transmembrana tipo I con un terminal amino que reconoce el antígeno, un espaciador, un dominio transmembrana, todo conectado a un endodominio compuesto que transmite señales de activación y supervivencia de células T (véase Figura 1A).

La forma más común de estas moléculas son fusiones de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) derivados de anticuerpos monoclonales que reconocen un antígeno objetivo, fusionado a través de un espaciador y un dominio transmembrana a un endodominio de señalización. Dichas moléculas dan como resultado la activación de las células T en respuesta al reconocimiento por parte del scFv de su objetivo. Cuando las células T expresan dicho CAR, reconocen y eliminan las células objetivo que expresan el antígeno objetivo. Se han desarrollado varios CAR contra antígenos asociados a tumores, y los enfoques de transferencia adoptiva que usan tales células T que expresan CAR se encuentran actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de varios tipos de cáncer.

Se ha observado que el uso de un enfoque con CAR para el tratamiento del cáncer, la heterogeneidad tumoral y la inmunoedición pueden provocar el escape del tratamiento con CAR. Por ejemplo, en el estudio descrito por Grupp et al., (2013; New Eng. J. Med 368: 1509-1518), se utilizó el enfoque de células T modificado con CAR para el tratamiento de la leucemia linfoide aguda. Se descubrió que un paciente del ensayo con CAR anti-CD19 recayó con enfermedad negativa para CD19 dos meses después del tratamiento.

Expresión de dos especificidades de unión a CAR

Se han desarrollado CAR biespecíficos conocidos como CAR en tándem o TanCAR en un intento de unir múltiples marcadores específicos de cáncer simultáneamente. En un TanCAR, el dominio extracelular comprende dos especificidades de unión a antígeno en tándem, unidas por un conector. Por lo tanto, las dos especificidades de unión

(scFv) están unidas a una sola porción transmembrana: un scFv está yuxtapuesto a la membrana y el otro en posición distal.

Grada et al., (2013, Mol Ther Nucleic Acids 2: e105 describe un TanCAR que incluye un scFv específico de CD19, seguido de un conector Gly-Ser y luego un scFv específico de HER2. El HER2-scFv estaba en la posición yuxtamembrana, y el CD19-scFv en la posición distal. Se demostró que el TanCAR induce distinta reactividad de las células T contra cada uno de los dos antígenos tumorales restringidos. Esta disposición se eligió debido a las longitudes respectivas de HER2 (632 aa/125Å) y CD19 (280aa, 65Å) se presta por sí misma para esa disposición espacial particular. También se sabía que el HER2-scFv unía los 4 bucles más distales de HER2.

El problema con este enfoque es que el scFv yuxtamembrana puede ser inaccesible debido a la presencia del scFv distal, especialmente el que está unido al antígeno. En vista de la necesidad de elegir las posiciones relativas de los dos scFv en vista de la disposición espacial del antígeno en la célula objetivo, puede que no sea posible utilizar este enfoque para todos los pares de unión de scFv. Además, es poco probable que el enfoque TanCAR pueda usarse para más de dos scFv, un TanCAR con tres o más scFv sería una molécula muy grande y los scFv podrían replegarse entre sí, ocultando los sitios de unión al antígeno. También es dudoso que la unión al antígeno por el scFv más distal, que está separado del dominio transmembrana por dos o más scFv adicionales, sea capaz de desencadenar la activación de las células T.

Una opción alternativa sería expresar dos o más CAR del mismo vector.

Se han desarrollado varios métodos diferentes para permitir la coexpresión de dos proteínas a partir de un solo vector (véase Figura 3).

Los intentos iniciales usaron dos promotores diferentes dentro del mismo casete. Esto da como resultado dos transcripciones separadas, cada una de las cuales codifica para una proteína separada. Este es un enfoque difícil por varias razones. Un problema clave es la "interferencia del promotor" mediante la cual un promotor domina y provoca el silenciamiento del segundo promotor. Además, diferentes promotores funcionan de manera diferente en diferentes contextos celulares y esto hace que el "ajuste" consistente de la expresión relativa de cada transgén sea difícil de lograr.

Un enfoque alternativo es usar una secuencia de entrada al ribosoma interno (IRES). En el presente documento, se genera una sola transcripción. La secuencia IRES en la transcripción se coloca entre los marcos de lectura abiertos para los dos transgenes e imita una estructura de caperuza de ARNm. Por lo tanto, el ribosoma inicia la traducción en la caperuza 5' o la IRES, lo que resulta en la expresión de dos proteínas separadas. Una limitación clave con este enfoque es la incapacidad de controlar la expresión relativa. La transcripción 3' generalmente se expresa menos que la 5', pero la relación de expresión es difícil de predecir y ajustar.

Se ha proporcionado un enfoque adicional después de la caracterización del papel del péptido 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV) para permitir que el FMDV (y los virus relacionados) expresen múltiples proteínas desde un único marco de lectura abierto (ORF) (Donnelly et al.; J. Gen. Virol.; 82, 1027-1041 (2001)). El péptido 2A (y sus homólogos) se escinde con una eficiencia muy alta inmediatamente después de la traducción del ORF, permitiendo la expresión de múltiples péptidos a partir de un solo ORF. Un problema con el uso del péptido 2A para escisión entre diferentes péptidos en el mismo ORF es que la expresión está limitada a una relación 1:1.

La expresión relativa de diferentes antígenos tumorales es muy variable. Para adaptar el reconocimiento de una célula tumoral por una célula que expresa dos o más CAR, sería muy ventajoso si la expresión relativa de los CAR en la superficie celular reflejara la expresión relativa de los antígenos en la célula tumoral.

Por lo tanto, existe la necesidad de métodos alternativos para expresar más de un CAR a partir de un único vector que permita tal "adaptación" del reconocimiento de antígeno.

Resumen de los aspectos de la invención

Los presentes inventores han desarrollado un panel de pares de receptores de antígenos quiméricos "controlados lógicamente" que, cuando son expresados por una célula, tal como una célula T, son capaces de detectar un patrón particular de expresión de al menos dos antígenos objetivo. Si los al menos dos antígenos objetivo se denotan arbitrariamente como antígeno A y antígeno B, las tres opciones posibles son las siguientes:

"COMPUERTA O ": la célula T se activa cuando el antígeno A o el antígeno B están presentes en la célula objetivo
"COMPUERTA Y ": la célula T se activa solo cuando ambos antígenos A y B están presentes en la célula objetivo
"COMPUERTA Y NO": la célula T se activa si el antígeno A está presente solo en la célula objetivo, pero no si ambos antígenos A y B están presentes en la célula objetivo.

Las células T modificadas que expresan estas combinaciones de CAR se pueden adaptar para que sean exquisitamente específicas para las células cancerosas, en función de su expresión particular (o falta de expresión) de dos o más marcadores.

Los presentes inventores también han descubierto que, cuando un CAR se coexpresa con un segundo CAR como una poliproteína que después de la traducción se escinde para separar los dos CAR, es posible modular la expresión relativa de la superficie celular de los dos CAR reduciendo el tráfico a la superficie celular de uno o ambos CAR y reduciendo su vida media en la superficie celular. Esto no necesita limitarse a un par de CAR, sino que puede usarse para permitir el control de la expresión relativa de múltiples proteínas traducidas inicialmente como una poliproteína.

Como se usa en el presente documento, 'poliproteína' se refiere a una secuencia de polipéptidos traducida a partir de un solo constructo de ácido nucleico como una única entidad, pero que comprende secuencias de polipéptidos que se separan posteriormente y que funcionan como entidades discretas (por ejemplo, CAR separados).

La presente invención se refiere a una compuerta lógica O, en la que la expresión relativa de los dos CAR se modula mediante la incorporación de una señal de retención intracelular en uno o ambos CAR y/o alterando el péptido de señalización de un CAR para eliminar o reemplazar aminoácidos hidrófobos.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un constructo de ácido nucleico que comprende la siguiente estructura:

A-X-B

en la cual

A y B son secuencias de ácido nucleico que codifican un primer receptor de antígeno quimérico (CAR) y un segundo CAR; y
X es una secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio de escisión,
en el que
el primer CAR y el segundo CAR reconocen diferentes antígenos;
el primer CAR y el segundo CAR comprenden cada uno un endodominio activador; y en el que

(a) el primer CAR y/o el segundo CAR comprenden una señal de retención intracelular seleccionada del siguiente grupo: una señal de endocitosis; una señal de retención de Golgi; una señal de reciclaje de la red trans-Golgi (TGN); una señal de retención del retículo endoplásmico (ER); y una señal de clasificación lisosómica; y/o
(b) el péptido de señalización del primer o segundo CAR comprende una o más mutaciones de tal manera que el péptido de señalización del primer CAR y el segundo CAR difieren en su número de aminoácidos hidrófobos y en el que un péptido de señalización comprende hasta cinco aminoácidos hidrófobos más que el otro péptido de señalización.

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

Cada CAR puede comprender:

(i) un dominio de unión a antígeno;
(ii) un espaciador; y
(iii) un dominio transmembrana.

El espaciador del primer CAR puede ser diferente al espaciador del segundo CAR. Por ejemplo, el espaciador del primer CAR puede tener una longitud y/o configuración diferente del espaciador del segundo CAR, de modo que cada CAR está diseñado para el reconocimiento de su respectivo antígeno objetivo.

Los dos o más CAR pueden tener porciones de alta homología, por ejemplo, los dominios de señalización transmembrana y/o intracelular pueden ser altamente homólogos. Si se usan los mismos conectores o similares para los dos CAR, entonces también serán altamente homólogos. Con el fin de evitar la recombinación homóloga entre las secuencias, porciones de áreas que codifican secuencias de alta homología pueden ser "codones desplazados". El desplazamiento de codones implica el uso de codones alternativos en regiones de secuencia que codifican secuencias de aminoácidos iguales o similares.

En una realización particular, un CAR se une a CD19 y el otro CAR se une a CD20. En otra realización, un CAR se une a CD19 y el otro CAR se une a CD22.

La presente invención se refiere a un método para modular la expresión relativa de dos (o más) CAR en una compuerta lógica O, mediante uno o ambos de los siguientes enfoques (a) por la incorporación de una señal de retención

intracelular en uno o ambos CAR y (b) alterando el péptido de señalización de un CAR para eliminar o reemplazar aminoácidos hidrófobos.

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

La señal de retención intracelular puede dirigir el CAR lejos de la ruta secretora y/o hacia un compartimiento intracelular unido a la membrana, tal como un compartimiento lisosómico, endosómico o de Golgi.

La señal de retención intracelular puede ser, por ejemplo, una señal de clasificación basada en tirosina, una señal de clasificación basada en dileucina, una señal de agrupación ácida, una señal de evitación lisosómica, una señal de tipo NPFX'(1,2)D, una señal KDEL, una señal KKX'X' o una señal KX'KX'X' (en las que X' es cualquier aminoácido).

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, LZX'Z[DE], LLDLL, PWDLW, KDEL, KKX'X' o KX'KX'X';
en las 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 7 a 11.

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

La señal de retención intracelular puede comprender la señal de retención intracelular adenoviral E3/19K. 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.

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

Los péptidos señal pueden ser diferentes y la secuencia de un péptido de señalización puede alterarse de modo que los aminoácidos hidrófobos se eliminen o reemplacen. Alternativamente, el primer péptido de señalización y el segundo péptido de señalización pueden derivarse de la misma secuencia, pero un péptido de señalización puede comprender una o más eliminaciones/sustituciones de aminoácidos para eliminar/reemplazar uno o más aminoácidos hidrófobos en comparación con el otro péptido de señalización.

El o los aminoácidos hidrófobos eliminados o reemplazados pueden seleccionarse del grupo: Alanina (A); Valina (V); Isoleucina (I); Leucina (L); Metionina (M); Fenilalanina (P); Tirosina (Y); Triptófano (W) o del grupo Valina (V); Isoleucina (I); Leucina (L); y Triptófano (W).

Para el enfoque (b), un péptido de señalización puede comprender una, dos, tres, cuatro o cinco mutaciones, de modo que tenga uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos hidrófobos menos que: la secuencia señal de tipo silvestre de la cual se deriva y/o el otro péptido de señalización.

En el constructo 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 de auto escisión, un sitio de escisión de furina o un sitio de escisión del virus del grabado del tabaco.

La secuencia de ácido nucleico de X puede ser una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de auto escisión 2A de un aftovirus o un cardiovirus o un péptido similar a 2A.

El constructo de ácido nucleico puede comprender una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de interés (POI). La POI puede ser una proteína transmembrana.

La POI puede seleccionarse 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 receptoras de citoquinas tales como IL1R, IL2R, IL7R, IL15R y moléculas relacionadas; o moléculas de unión tales como N-CAM, V-CAM, L1-CAM, LFA-1, CDH1-3, selectinas o integrinas. La POI puede ser un tercer CAR.

La POI puede ser una proteína sintética tal como un gen suicida o un gen marcador.

La cantidad de un CAR que comprende una señal de retención intracelular y/o que tiene un péptido de señalización alterado que se expresa en la superficie celular puede ser, por ejemplo, inferior al 90%, 70%, 50% o 30% en

comparación a un CAR expresado a partir del mismo constructo de ácido nucleico que no comprende una señal de retención intracelular y que tiene un péptido de señalización inalterado.

La invención también proporciona un constructo de ácido nucleico que comprende la siguiente estructura:

A-X-B-Y-C

en la cual

A, B y C son secuencias de ácido nucleico que codifican un primer, segundo y tercer polipéptidos de interés (POI); y
X e Y son secuencias de ácido nucleico que pueden ser iguales o diferentes, cada una de las cuales codifica un sitio de escisión,
en las que al menos dos de los POI son receptores de antígeno quimérico (CAR) que comprenden una señal de retención intracelular; y/o difieren en el número de aminoácidos hidrófobos en sus péptidos señal.

En esta realización, los al menos dos POI que son CAR y que comprenden una señal de retención intracelular pueden:

(a) comprender diferentes señales de retención intracelular; y/o
(b) tener la señal de retención intracelular ubicada en una posición diferente en el CAR,

de modo que cuando el ácido nucleico se expresa en una célula, existe una expresión relativa diferencial de los al menos dos CAR en la superficie celular.

El tercer POI puede ser un polipéptido que permite la selección de células transducidas y/o permite que se eliminen las células que expresan el polipéptido.

El tercer POI puede ser otro CAR. Por lo tanto, la presente invención proporciona un constructo de ácido nucleico que, cuando es expresado por una célula, hace que la célula exprese dos o más CAR en la superficie celular, de modo que sea específicamente estimulada por una célula, tal como una célula tumoral, que porta un patrón distinto de dos o más antígenos. La expresión de cada CAR en la superficie celular puede adaptarse para reflejar la expresión de cada antígeno en la célula objetivo.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende un constructo de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

El vector puede ser un vector retroviral o un vector lentiviral o un transposón.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una célula que comprende un constructo de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la invención o un vector de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

La célula puede ser una célula inmune tal como una célula T o una célula asesina natural (NK).

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: un constructo de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la invención o un vector de acuerdo con al segundo aspecto de la invención, en una célula *ex vivo*.

La célula puede ser parte o derivarse de una muestra aislada de un sujeto.

La célula utilizada en el método del cuarto aspecto de la invención puede ser de 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.

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 células T y/o NK autólogas.

En este documento se describe un método para tratar y/o prevenir 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 células T y/o NK de un sujeto;
(ii) transducción o transfección de las células T y/o NK con: un constructo 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) administrar las células T y/o NK de (ii) a un sujeto.

En un sexto aspecto, la presente invención 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.

También se describe en el presente documento el uso de una célula de acuerdo con el tercer aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir una enfermedad.

La invención se refiere además a un método para modular la expresión relativa de la superficie celular de un primer receptor de antígeno quimérico (CAR) expresado a partir de un constructo de ácido nucleico único con un segundo CAR mediante (a) la inclusión de una señal de retención intracelular en la secuencia de ácido nucleico que codifica el primer y/o segundo CAR y/o (b) alterando la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de señalización de un CAR para eliminar o reemplazar uno o más aminoácidos hidrófobos en comparación con el péptido de señalización del otro CR. El constructo de ácido nucleico puede ser como se define en el primer aspecto de la invención.

Al proporcionar dos o más CAR en la superficie de la célula T, es posible unir múltiples marcadores de cáncer simultáneamente, proporcionando una mejor eficacia terapéutica para tumores heterogéneos y evitando el problema del escape del cáncer.

Como los CAR se expresan en la superficie de la célula T como moléculas separadas, este enfoque supera los problemas espaciales y de accesibilidad asociados con los TanCAR. La eficiencia de activación de las células T también se mejora. Como cada CAR tiene su propio espaciador, es posible adaptar el espaciador y, por lo tanto, la distancia que el dominio de unión se proyecta desde la superficie de las células T y su flexibilidad, etc., al antígeno objetivo particular. Esta elección no se ve afectada por las consideraciones de diseño asociadas con los TanCAR, es decir, que un CAR necesita estar en yuxtaposición a la membrana de la célula T y un CAR debe estar distal, colocado en tándem con el primer CAR.

Al proporcionar un único ácido nucleico que codifica los dos CAR separados por un sitio de escisión, es posible modificar células T para coexpresar los dos CAR usando un procedimiento simple de transducción sencilla. Se podría usar un procedimiento de transfección doble con secuencias que codifican CAR en constructos separados, pero esto sería más complejo y costoso y requeriría más sitios de integración para los ácidos nucleicos. Un procedimiento de doble transfección también se asociaría con la incertidumbre sobre si ambos ácidos nucleicos que codifican CAR han sido transducidos y expresados de manera efectiva. Esto es especialmente cierto para un enfoque de CAR múltiple en el que se introducen tres o más CAR en la célula.

La inclusión de una señal de retención intracelular en un CAR, o la alteración del péptido de señalización del CAR para reducir el número 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 un solo constructo. Como un CAR solo está activo en la superficie celular, la reducción de la expresión relativa de la superficie celular del CAR también reduce su actividad relativa.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un constructo de ácido nucleico que codifica una compuerta O, en la que el nivel relativo de expresión de los dos o más CAR puede ajustarse finamente, dependiendo del nivel relativo de expresión de los antígenos respectivos en la célula objetivo.

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

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 transmembrana 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 transmitieron señales ITAM solo a través del endodominio FcεR1-γ o CD3ζ, mientras que los diseños posteriores transmitieron además (c) uno o (d) dos señales coestimuladores en cis.

Figura 2: Diagrama esquemático que ilustra las compuertas lógicas
La invención se refiere a la modificación de células T para responder a reglas lógicas de expresión de antígeno de células objetivo. Esto se ilustra mejor con un diagrama de dispersión imaginario de FACS. Las poblaciones de células objetivo expresan ambos, uno o ninguno de los antígenos "A" y "B". Diferentes poblaciones objetivo (marcadas en rojo) son destruidas por las células T transducidas con un par de CAR conectados por diferentes compuertas. Con los receptores con compuerta O, se eliminarán tanto las células positivas sencillas como las positivas dobles. Con los receptores Y, solo se eliminan las células objetivo doblemente positivas. Con la compuerta Y NO, los objetivos con doble positivo se conservan, mientras que los objetivos con un solo positivo serán eliminados.

Figura 3: Creación de poblaciones de células objetivo.

Las células SupT1 se usaron como células objetivo. Estas células se transdujeron para expresar CD19, CD33 o tanto CD19 como CD33. Las células objetivo se tiñeron con anticuerpos apropiados y se analizaron por citometría de flujo.

Figura 4: Diseño del casete para una compuerta O
Un solo marco de lectura abierto le proporciona a ambos CAR una secuencia FMD-2A dentro del marco que da como resultado dos proteínas. Señal 1 es un péptido de señalización derivado de IgG1 (pero puede ser cualquier péptido de señalización 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 objetivo arbitrario deseado). STK es el tallo de CD8 pero puede ser cualquier dominio extracelular adecuado. CD28tm es el dominio transmembrana CD28 pero puede ser cualquier dominio transmembrana de proteína tipo I estable y CD3Z es el endodominio CD3 Zeta pero puede ser cualquier endodominio que contenga ITAM. Señal 2 es un péptido de señalización derivado de CD8 pero puede ser cualquier péptido de señalización efectivo que sea diferente en la secuencia de ADN de la signal1. scFv reconoce CD33 pero en cuanto a scFv1 es arbitrario. HC2CH3 es la bisagra-CH2-CH3 de IgG1 humana, pero puede ser cualquier dominio extracelular que no se empareje en forma cruzada con el espaciador utilizado en el primer CAR. Los códigos de CD28tm' y CD3Z' para la misma secuencia de proteínas que CD28tm y CD3Z son de codón desplazado para evitar la recombinación homóloga.

Figura 5: Representación esquemática de los receptores de antígeno quimérico (CAR) para una compuerta O
Se construyeron CAR estimuladores que consisten ya sea en un terminal N, A) dominio de scFv anti-CD19 seguido por la región de bisagra extracelular de CD8 humano o B) dominio de scFv anti-CD33 seguido por la región bisagra extracelular, región CH2 y CH3 (que contiene una mutación pvaa para reducir la unión a FcR) de IgG1 humana. Ambos receptores contienen un dominio transmembrana CD28 humano y un dominio intracelular CD3 Zeta humano (CD247). "S" representa la presencia de enlaces disulfuro.

Figura 6: Datos de expresión que muestran la coexpresión de ambos CAR en la superficie de una célula T.

Figura 7: Análisis funcional de la compuerta O
Las células efectoras (5 x 10^4 células) que expresan el constructo de la compuerta O se incubaron conjuntamente con un número variable de células objetivo y se analizó IL-2 después de 16 horas mediante ELISA. El gráfico muestra la secreción máxima promedio de IL-2 de una estimulación química (PMA y Ionomicina) de las células efectoras solas y la IL-2 de fondo promedio de las células efectoras sin ningún estímulo a partir de tres réplicas.

Figura 8: Métodos utilizados para expresar diferentes proteínas del mismo vector.
(a) Dos promotores diferentes dentro del mismo casete dan como resultado dos transcripciones diferentes que dan lugar a proteínas separadas. (b) El uso de una secuencia de entrada de ribosoma interno (IRES) conduce a una única transcripción que se traduce en dos proteínas separadas. (c) El uso del péptido 2A del FMDV da como resultado una única transcripción y una única poliproteína que se divide rápidamente en dos proteínas separadas.

Figura 9: el endodominio TYRP1 puede dirigir la retención de una proteína transmembrana con un endodominio complejo
Tyrp1 es una proteína transmembrana tipo I, de 537 aa de largo. El motivo de la dileucina, que retiene la proteína en el compartimento intracelular, se indica como un rectángulo negro en el dominio citoplasmático. (A) Tyrp1 (tipo silvestre). Tyrp1 de tipo silvestre consta de una señal peptídica, un dominio luminal, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. El dominio citoplasmático contiene la señal de retención de dileucina. (B) Tyrp1 (tipo silvestre)-Conector-SG-eGFP. Este constructo contiene el Tyrp1 de tipo silvestre simplemente fusionado a eGFP a través de un conector serina-glicina-glicina-glicina-serina. El Tyrp1-L-eGFP representa el Tyrp1 proximal citoplasmático. (C) Tyrp1 Lumenal (LM)-Transmembrana (TM)-Conector SG - eGFP- Tyrp1 citoplasmático (CP). Este constructo constituye el Tyrp1 citoplasmático distal, ya que el conector SG-eGFP se interpone entre los dominios transmembrana y citoplasmático. (D): Tyrp1 Lumenal (LM)-Transmembrana (TM)-conector SG-eGFP. Este constructo sirve como control positivo, ya que el dominio citoplasmático que contiene la señal de retención ha sido excluido. Todas los constructos se coexpresan con IRES.CD34. La tinción de las células SupT1 transducidas se muestran con tinción intracelular y superficial en la parte inferior izquierda/derecha, respectivamente.

Figura 10: Funcionalidad de la señal de retención TYRP1 en células primarias
Se generó un constructo que coexpresa un CAR anti-CD19 y un anti-CD33 usando un péptido similar a FMD-2A. También se generaron dos variantes de este constructo: en la primera variante, el motivo de dileucina de TYRP1 se insertó en el endodominio CAR anti-CD19 justo próximo al dominio TM; en la segunda variante, el mismo motivo de dileucina TYRP1 se unió al terminal carboxilo del endodominio CAR anti-CD19. Las PBMC se aislaron de la sangre y se estimularon usando PHA e IL-2. Dos días después, las células se transdujeron en placas recubiertas con retronectina con retrovirus que contenía los diferentes constructos CAR de CD19:CD33. El día 5, se evaluó el nivel de expresión de los dos CAR traducidos por el constructo mediante citometría de flujo usando fusiones de CD19-Fc y CD33-Fc recombinantes. A. Muestra una caricatura del gen sintético construido para permitir la coexpresión; B. Muestra una caricatura de los pares de proteínas subsiguientes generados por los tres constructos; C. Muestra la expresión de los dos receptores por citometría de flujo. En el constructo original, ambos CAR se expresan igualmente. Con la incorporación del motivo de dileucina distalmente en el endodominio del CAR anti-CD19, la expresión de CAR de CD33 permanece constante pero la expresión de CD19 cae a niveles intermedios. Con la incorporación del motivo

de dileucina proximalmente en el endodominio del CAR anti-CD19, la expresión de CAR de CD33 permanece constante, pero la expresión de CD19 cae a niveles bajos.

Figura 11: Señal de retención de la cola citosólica de E3/19K
Se generó un constructo que coexpresa un CAR anti-CD19 y un anti-CD33 usando un péptido similar a FMD-2A. También se generaron dos variantes de este constructo: en la primera variante, los últimos 6 aa de E3/19K (DEKKMP), que se encontraron críticos por su capacidad de retención de Golgi/ER, se unieron al terminal carboxilo del endodominio de CAR anti-CD33; en la segunda variante, toda la cola citosólica de la proteína E3/19K del adenovirus se unió al terminal carboxilo del endodominio CAR anti-CD33

Figura 12: Funcionalidad de la señal de retención de E3/19K
Los constructos mostradas en la Figura 4 se transfectaron en células 293T y se evaluó el nivel de expresión de los dos CAR traducidos por el constructo mediante citometría de flujo usando fusiones de CD19-Fc y CD33-Fc recombinantes. Se observó una retención clara cuando la proteína de longitud completa E3/19K del adenovirus, o el motivo DEKKMP se colocó en el receptor anti-CD33. Los niveles de expresión del receptor anti-CD19 no se vieron afectados.

Figura 13: Diagrama esquemático que ilustra la función de las secuencias de señal en el direccionamiento de proteínas

Figura 14: Diagrama esquemático del constructo de ácido nucleico que codifica dos CAR

Figura 15: Verificación de la función de una secuencia de señal sustituida.
El documento PCT/GB2014/053452 describe el sistema de vector que codifica dos receptores de antígeno quimérico (CAR), uno contra CD19 y otro contra CD33. El péptido de señalización utilizado para los CAR en ese estudio fue el péptido de señalización de la secuencia señal humana CD8a. Para los propósitos de este estudio, este fue sustituido con el péptido de señalización de la región V-III de la cadena kappa de Ig murina, que tiene la secuencia: METD**TLILWVLLLLV**PGSTG (residuos hidrófobos resaltados en negrita). Para establecer que la secuencia señal V-III de la cadena kappa de Ig murina funcionaba tan bien como la secuencia señal de CD8a humano, se realizó un estudio comparativo. Para ambas secuencias señal, se observó la expresión funcional de CAR anti-CD33 y CAR anti-CD19.

Figura 16: Prueba del efecto de la eliminación de un aminoácido en la región V-III de la cadena kappa de Ig murina. Se creó la cadena kappa mutante 1 con la siguiente eliminación (mostrada en gris) en la región h METD**TLILWVLLLLV**PGSTG y se observó la expresión relativa en CAR anti-CD33 y CAR anti-CD19.

Figura 17: Prueba del efecto de dos eliminaciones de aminoácidos en la región V-III de la cadena kappa de Ig murina. Se creó la cadena kappa mutante 2 con las siguientes eliminaciones (mostradas en gris) en la región h METD**TLILWVLLLLV**PGSTG y se observó la expresión relativa en CAR anti-CD33 y CAR anti-CD19.

Figura 18: Prueba del efecto de tres eliminaciones de aminoácidos en la región V-III de la cadena kappa de Ig murina. Se creó la cadena kappa mutante 2 con las siguientes eliminaciones (mostradas en gris) en la región h METD**TLILWVLLLLV**PGSTG y se observó la expresión relativa en CAR anti-CD33 y CAR anti-CD19.

Figura 19: Prueba del efecto de cinco eliminaciones de aminoácidos en la región V-III de la cadena kappa de Ig murina. Se creó la cadena kappa mutante 2 con las siguientes eliminaciones (mostradas en gris) en la región h METD**T**LI**LWVLLL**LVPGSTG y se observó la expresión relativa en CAR anti-CD33 y CAR anti-CD19

Descripción detallada

Receptores de antígeno quimérico (CAR)

La presente invención proporciona un constructo de ácido nucleico que expresa dos o más receptores de antígeno quimérico (CAR).

Los CAR, que se muestran esquemáticamente en la Figura 1, son proteínas quiméricas transmembrana de tipo I que conectan un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular (aglutinante) a un dominio de señalización intracelular (endodominio). El aglutinante 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. Por lo general, es necesario un dominio espaciador para aislar el aglutinante de la membrana y permitirle una orientación adecuada. Un dominio espaciador común utilizado es el Fc de IgG1. Los espaciadores más compactos pueden ser suficientes, por ejemplo el tallo de CD8a e incluso solo la bisagra IgG1 sola, dependiendo del antígeno. Un dominio transmembrana ancla la proteína en la membrana celular y conecta el espaciador al endodominio.

Los diseños de CAR tempranos tenían endodominios derivados de las partes intracelulares de la cadena γ de FcεR1 o CD3ζ. En consecuencia, estos receptores de primera generación transmitieron la señal inmunológica 1, que fue

suficiente para desencadenar la muerte de las células T de las células objetivo relacionadas, pero no pudo activar completamente las células 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 células 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 proporciona la señal coestimuladora más potente, a saber, la señal inmunológica 2, que desencadena la proliferación de células T. También se han descrito algunos receptores que incluyen los endodominios de la familia de receptores de TNF, tales como el OX40 y el 41BB estrechamente relacionados que transmiten señales de supervivencia. Incluso se han descrito CAR más potentes de tercera generación que tienen endodominios capaces de transmitir señales de activación, proliferación y supervivencia.

Los ácidos nucleicos que codifican CAR pueden transferirse a células (tal como células T) usando, por ejemplo, vectores retrovirales o lentivirales. De esta manera, se puede generar una gran cantidad de células T específicas de cáncer para la transferencia de células adoptivas. Cuando el CAR se une al antígeno objetivo, esto da como resultado la transmisión de una señal de activación a la célula T en la que se expresa. Por lo tanto, el CAR dirige la especificidad y la citotoxicidad de la célula T hacia las células tumorales que expresan el antígeno objetivo.

Los inventores han definido tres categorías distintas de células que coexpresan un primer CAR y un segundo CAR de modo que la célula pueda reconocer un patrón de expresión deseado en las células objetivo en la forma de una compuerta lógica como se detalla en las tablas de verdad: Tablas 1, 2 y 3.

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

(i) un dominio de unión a antígeno;
(ii) un espaciador;
(iii) un dominio transmembrana; y
(iv) un dominio intracelular, que puede comprender o asociarse con un endodominio de señalización de células T.

Tabla 1: Tabla de verdad para la COMPUERTA 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 COMPUERTA Y de CAR

Antígeno A	Antígeno B	Respuesta
Ausente	Ausente	Sin activación
Ausente	Presente	Sin activación
Presente	Ausente	Sin activación
Presente	Presente	Activación

Tabla 3: Tabla de verdad para COMPUERTA Y NO de CAR

Antígeno A	Antígeno B	Respuesta
Ausente	Ausente	Sin activación
Ausente	Presente	Sin activación
Presente	Ausente	Activación
Presente	Presente	Sin activación

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

La SEQ ID NO. 4 es un ejemplo de una compuerta O, que comprende dos CAR. El constructo de ácido nucleico de la invención puede comprender una u otra parte de la siguiente secuencia de aminoácidos, que corresponde a un solo CAR. Una o ambas secuencias de CAR pueden modificarse para incluir una o más señales de retención intracelular, y/o para alterar sus péptidos señal, como se define a continuación.

La SEQ ID NO. 4 es una compuerta O de CAR que reconoce CD19 O CD33
SEQ ID NO. 4

MSLPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD
GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTK
LEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG
VSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
AVHTRGLDFACDIFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRAEGRGSLLTCGDVEENPGPMAVPTQ
VLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLI
YDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTKLEIKRS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMH
WIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
AAQDAYTGGYFDYWGQGTLVTVSSMDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK
DTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSRVKFSRSADAPA
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

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

Péptido señal derivado de CD8a humano:
MSLPVTALLLPLALLLHAARP

ScFv aCD19
DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITKAGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIW
GSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQG
TSVTVS

Conector:
SD

CD8aSTK humano:
PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

CD28TM Humana:
FVWLVWGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

Dominio intracelular de CD3zeta Humana
RRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Péptido 2A:
RAEGRGSLLTCGDVEENPGP

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

RCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPS
RFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTKLEIKRSGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEW
VSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFD
YWGQGTLVTVSSM

Conector:
DPA

Bisagra y Fc derivados de IgG1 humana con mutaciones para prevenir la asociación de FcRg (HCH2CH3pvaa):
EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Conector:
KDPK

CD28TM Humana:
FVWLVWGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

Conector:
RS

Dominio intracelular de CD3zeta Humana:
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL
YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

La presente invención se refiere a la modulación de la expresión relativa de los dos o más CAR en una compuerta O. Esto puede hacerse, por ejemplo, mediante la inclusión de una señal de retención intracelular en uno u otro CAR.

En relación con la SEQ ID NO. 4 dada 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 en forma fina eligiendo una determinada posición para la señal de retención en la molécula.

Por ejemplo, el constructo de ácido nucleico puede comprender una secuencia de proteína de retención tyrp-1, tal como:
RARRSMDEANQPLLTDQYQCYAEEYEKLQNPNQSVV

Una secuencia de este tipo puede incluirse, por ejemplo, en la secuencia CAR de CD19 para que el nivel relativo de expresión de CAR de CD19 se reduzca con respecto a CAR de CD33.

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

Alternativamente, el constructo de ácido nucleico puede comprender la señal de retención intracelular E3/19K adenoviral. La señal de retención intracelular puede comprender el dominio citosólico E3/19K KYKSRRSFIDEKKMP (SEQ ID NO. 2) o una porción de la mismo, tal como la secuencia DEKKMP (SEQ ID NO. 3).

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

El constructo de ácido nucleico de la invención puede codificar la SEQ ID NO. 4 o cualquiera de sus partes componentes, tales como el CAR de CD19 o el CAR de CD33. El constructo de ácido nucleico de la invención puede codificar una variante de la parte que codifica CAR de la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 4 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 porcentaje de identidad de secuencia se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son idénticos en las dos secuencias cuando están alineados de manera óptima. La homología o identidad de la secuencia de nucleótidos y proteínas se puede determinar utilizando algoritmos estándar como un programa BLAST (Herramienta de búsqueda de alineación local básica en el 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 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 secuencias múltiples 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).

En la compuerta O lógica de CAR, los dominios de unión a antígeno del primer y segundo CAR se unen a diferentes antígenos y ambos CAR comprenden un endodominio activador. Los dominios espaciadores pueden ser iguales o suficientemente diferentes para evitar el emparejamiento cruzado de los dos receptores diferentes. Por lo tanto, una célula puede ser modificada para activarse tras el reconocimiento de uno o ambos antígenos. Esto es útil en el campo de la oncología, como lo indica la hipótesis de Goldie-Coldman: el único direccionamiento de un solo antígeno puede provocar el escape del tumor por la modulación de dicho antígeno debido a la alta tasa de mutación inherente en la mayoría de los cánceres. Al apuntar simultáneamente a dos antígenos, la probabilidad de tal escape se reduce exponencialmente.

Se conocen diversos antígenos asociados a tumores como se muestra en la siguiente Tabla 4. Para una enfermedad dada, el primer CAR y el segundo CAR pueden unirse a dos TAA diferentes asociados con esa enfermedad. De esta forma, se evita el escape tumoral al modular un solo antígeno, ya que también se dirige un segundo antígeno. Por ejemplo, cuando se dirige a una neoplasia maligna de células B, tanto CD19 como CD20 pueden ser dirigidos simultáneamente. Con una compuerta O lógica de CAR, es importante que los dos CAR no se heterodimerizan.

Tabla 4

Tipo de cáncer	TAA
Linfoma difuso de células B grandes	CD19, CD20
Cáncer de mama	ErbB2, MUC1
AML	CD13, CD33
Neuroblastoma	GD2, NCAM
B-CLL	CD19, CD52
Cáncer colorrectal	Proteína de unión a folato, CA-125

Expresión diferencial de antígenos objetivo

CD19/CD22

El constructo de ácido nucleico de la presente invención puede codificar una compuerta O que comprende un CD19 que reconoce CAR y un CD22 que reconoce CAR. Una compuerta O de CD19/CD22 es útil para el tratamiento de una serie de neoplasias malignas de células B, incluidas la leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL), el linfoma de células B y la leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL).

Se ha informado en varios estudios que los niveles de expresión de CD19 y CD22 son muy diferentes en estas condiciones.

Por ejemplo, Haso et al., (2013, Blood 121: 1165-1174) midieron la expresión superficial de CD22 y CD19 en varias líneas celulares de ALL precursoras de células B y descubrieron que todas las líneas celulares expresaban tanto CD22 como CD19, pero CD19 tenía un densidad de sitio significativamente mayor (la expresión de CD22 varió de 6,485 a 54,878 moléculas/célula versus un intervalo de expresión de CD19 de 14,112 a 56,946 moléculas/célula).

De manera similar, Du et al., (2008 Cancer Res 68: 6300-6305) examinaron los niveles de expresión superficial de CD19 y CD22 en seis líneas de linfoma de células B y descubrieron que los niveles de CD19 eran 4-9 veces más altos que los niveles de CD22 en las células de linfoma de células B (los niveles de CD19 oscilaron entre 210,000 y 578,000 sitios por célula, mientras que los niveles de CD22 variaron entre 26,000 y 94,000 sitios por célula).

En la compuerta O de la presente invención, la expresión relativa de CAR de CD19 y CAR de CD22 puede modificarse para reflejar los niveles relativos de CD19 y CD22 en las células cancerosas. El nivel de expresión del CAR de CD22 puede reducirse mediante la incorporación de una señal de retención intracelular o alterando el péptido de señalización de modo que tenga menos aminoácidos hidrófobos que el péptido de señalización del CAR de CD19.

CD19/CD20

Berton et al., (2014, Haematol & Oncol 7:33) investigaron los valores medios de capacidad de unión a anticuerpos de CD19 y CD20 en tumores malignos B primarios y líneas celulares B, como sigue:

Raji, Ramos, Namalwa: líneas celulares del linfoma de Burkitt humanas
SU-DHL-6: línea celular de linfoma histiocítico difuso humano
Mec-1: línea celular de B-CLL humano

Se descubrió que para las líneas celulares de linfoma de Burkitt humano, el número de sitios antigénicos era 2-27 veces mayor para CD20 que para CD19. Por el contrario, el número de sitios antigénicos para CD19 fue mayor que CD20 para la línea celular de linfoma histiocítico difuso humano (22 veces) y la línea celular de B-CLL (3 veces).

La compuerta O de la presente invención puede comprender un que un CAR reconoce CD19 y un CAR que reconoce CD20. La expresión relativa del CAR de CD19 y del CAR de CD20 puede modificarse para reflejar los niveles relativos de CD19 y CD20 en las células cancerosas. Para algunos tipos de cáncer, el nivel de expresión del CAR de CD20 puede reducirse mediante la incorporación de una señal de retención intracelular o alterando el péptido de señalización de modo que tenga menos aminoácidos hidrófobos que el péptido de señalización del CAR de CD19. Para otros tipos de cáncer, el nivel de expresión del CAR de CD19 puede reducirse mediante la incorporación de una señal de retención intracelular o alterando el péptido de señalización de modo que tenga menos aminoácidos hidrófobos que el péptido de señalización del CAR de CD20.

Péptido señal

Los polipéptidos A y B (y opcionalmente otros, C, D, etc.) codificados por el constructo de ácido nucleico de la invención pueden comprender cada uno una secuencia señal de modo que cuando el polipéptido se expresa dentro de una célula, la proteína naciente se dirige al retículo endoplásmico (ER) (véase la Figura 13).

El término "péptido de señalización" es sinónimo de "secuencia señal".

Un péptido de señalización es un péptido corto, comúnmente de 5 a 30 aminoácidos de longitud, presente en el terminal 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, golgi o los endosomas), son secretadas por la célula y las proteínas transmembrana.

Los péptidos señal contienen comúnmente una secuencia central que es un tramo largo de aminoácidos hidrófobos que tiene una tendencia a formar una única hélice alfa. El péptido de señalización puede comenzar con un tramo corto de aminoácidos con carga positiva, lo que ayuda a reforzar la topología adecuada del polipéptido durante la translocación. Al final del péptido de señalización, típicamente hay un tramo de aminoácidos que es reconocido y escindido por la peptidasa señal. La peptidasa señal puede escindirse durante o después de la finalización de la translocación para generar un péptido de señalización libre y una proteína madura. Los péptidos señal libres son luego digeridos por proteasas específicas.

El péptido de señalización se coloca comúnmente en el terminal amino de la molécula, aunque se conocen algunos péptidos señal del terminal carboxilo.

Como se mencionó anteriormente, las secuencias señal tienen una 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 la peptidasa señal (SPasa). Usualmente, las secuencias señal se escinden de manera cotraduccional, las secuencias señal escindidas resultantes se denominan péptidos señal.

En el péptido de señalización de la región V-III de la cadena kappa de Ig murina, que tiene la secuencia: METD**TLILWVLLLLV**PGSTG: 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.

En el constructo 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.

En el constructo de ácido nucleico de la presente invención, la secuencia señal de los dos (o más) polipéptidos, por lo tanto, pueden 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 señalización del polipéptido con menor expresión relativa puede comprender una o más mutaciones de aminoácidos, tales como sustituciones o eliminaciones, de aminoácidos hidrófobos en la región h que el péptido de señalización del polipéptido con menor expresión relativa.

El primer péptido de señalización y el segundo péptido de señalización pueden tener sustancialmente las mismas regiones n y c, pero difieren 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 señalización o pueden diferir en uno, dos o tres aminoácidos en la cadena n o c, sin afectar la función del péptido de señalización.

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

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

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

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

El péptido de señalización alterado puede comprender 1, 2, 3, 4 o 5 eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de aminoácidos hidrófobos. Los aminoácidos hidrófobos pueden reemplazarse por aminoácidos no hidrófobos, tales como los aminoácidos hidrofílicos o neutros.

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

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

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

Tabla 5

Número de Acceso	Nombre de la entrada	Nombre de la proteína	Longitud	Secuencia señal (centro hidrófobo)
P01730	CD4_ HUMANA	Glicoproteína de superficie de células T CD4	25	MNRGVPFRH**LLLVLQLALL**PAATQ G
P08575	CD45_HUMANA	Antígeno común de leucocitos	23	MYLWLK**LLAFGFAFL**DTE**VFV**TG
P01732	CD8A_HUMANA	Cadena alfa de la glicoproteína de superficie de células T CD8	21	MAL**PVTALLLPLALLL**HAARP
P10966	CD8B_HUMANA	Cadena beta de la glicoproteína de superficie de células T CD8	21	MRPRLW**LLLAAQLTVL**HGNSV
P06729	CD2_HUMANA	Antígeno de superficie de células T CD2	24	MSFPCKF**VASFLLIF**N**V**SSKGAVS
P06127	CD5_HUMANA	Glicoproteína de superficie de células T CD5	24	MPMGSLQP**LATLYLLGMLVASCL**G
P09564	CD7_HUMANA	Antígeno de células T CD7	25	MAGPPR**LLLLPLLLALA**RGLPGALA
P17643	TYRP1_HUMANA	Ácido 5,6-dihIdroxlindol-2-carboxílico oxidasa	24	MSAPK**LLSLGOFFPLLLF**QQARA
P00709	LALBA_HUMANA	Alfa lactoalbúmina	19	MR**FFVPLFLVGILF**PAILA
P16278	BGAL_HUMANA	Beta galactosidasa	23	MPG**FLVRILPLLLVLLLL**GPTRG
P31358	CD52_HUMANA	Antígeno CAMPATH-1	24	MKR**FLFLLLTISLLVM**VQIQTGLS
Q6YHK3	CD109_HUMANA	Antígeno CD109	21	MQGFP**LLTAAHLLCVCTAAL**A
P01024	CO3_HUMANA	Complemento C3	22	MGPTSGPS**LLLLLLT**HL**PLAL**G
P10144	GRAB_HUMANA	Granzima B	18	MQ**PILLLLAFLLL**PRADA
P04434	KV310_HUMANA	región VH V-III de la cadena kappa de Ig	20	MEAPAQLLF**LLLL**WLPDTTR
P06312	KV401_HUMANA	región V-VI de la cadena kappa de Ig	20	MVLQTQ**VFISLLL**WISGAYG
P06319	LV605_HUMAN	Región EB4 V-VI de la cadena lambda de Ig	19	MAWAP**LLLTLLA**HCIDCWA
P31785	IL2RG_HUMAN	Cadena gamma común del receptor de citocinas	22	MLKPSLPFTS**LLFLQLPLLGV**G

(continuación)

Número de Acceso	Nombre de la entrada	Nombre de la proteína	Longitud	Secuencia señal (centro hidrófobo)
Q8N4F0	BPIL1_HUMAN	proteína tipo 1 que aumenta la capacidad bactericida/ permeabilidad	20	MAWASR**LGLLLALLLP**WGA
P55899	FCGRN_HUMAN	subunidad p51 grande de FcRn receptor de IgG	23	MGVPRPQPW**ALGLLLFLL**PGSLG

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

El término "tipo silvestre" también incluye péptidos señal derivados de una proteína natural que comprende una o más mutaciones de aminoácidos en la región n o c. Por ejemplo, es común modificar un péptido de señalización natural con una sustitución de aminoácidos conservada en el terminal 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 invención también se refiere a secuencias de péptidos señal sintéticos, que no pueden definirse con referencia a una secuencia de tipo silvestre. En esta realización, el péptido de señalización de un polipéptido comprende menos aminoácidos hidrófobos que la secuencia señal del otro polipéptido. Las dos secuencias señal pueden derivarse de la misma secuencia de péptido de señalización sintético, pero difieren en el número de aminoácidos hidrófobos en la región central.

Dominio de unión a antígeno

El dominio de unión a 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 células 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 objetivo; un péptido con suficiente afinidad por el objetivo; un anticuerpo de dominio único; un aglutinante artificial simple tal como Darpina (proteína diseñada de repeticiones de anquirina); o una cadena sencilla derivada de un receptor de células 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 superficie de células tumorales (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 la contraparte del 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.

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

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

El primer y segundo CAR codificados por el constructo de ácido nucleico de la invención pueden comprender diferentes moléculas espaciadoras. Por ejemplo, la secuencia espaciadora puede, por ejemplo, comprender una región Fc de IgG1, una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8 humano o el tallo de CD8 de ratón. El espaciador puede comprender alternativamente una secuencia conectora alternativa que tiene propiedades de espaciamiento de longitud y/o dominio similares a las de una región Fc de IgG1, una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8. Se puede alterar un espaciador IgG1 humano para eliminar los motivos de unión a Fc.

A continuación se presentan ejemplos de secuencias de aminoácidos para estos espaciadores:

SEQ ID NO. 5 (bisagra-CH2CH3 de IgG1 humana)

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD

SEQ ID NO. 6 (tallo de CD8 humano):
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

SEQ ID NO. 7 (bisagra de IgG1 humana):
AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

SEQ ID NO. 8 (ectodominio de CD2)
KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSDKKKIAQFRKEKETFKEKDTYKLF
KNGTLKIKHLKTDDQDIYKVSIYDTKGKNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTCINTTLTCEVMNG
TDPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAKFKCTAGNKVSKESSVEPVSCP
EKGLD

SEQ ID NO. 9 (ectodominio de CD34)

SLDNNGTATPELPTQGTFSNVSTNVSYQETTTPSTLGSTSLHPVSQHGNEATTNITETTVKF
TSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATS
PTKPYTSSSPILSDIKAEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQ
ADADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLANRTEISSKLQLMKKHQSDLKKLGILDFTEQDVA
SHQSYSQKT

Dado que los CAR son típicamente homodímeros (véase la Figura 1a), el emparejamiento cruzado puede dar como resultado un receptor de antígeno quimérico heterodimérico. Esto no es deseable por varias razones, por ejemplo: (1) el epítopo puede no estar en el mismo "nivel" en la célula objetivo, de modo que un CAR emparejado en forma cruzada solo puede unirse a un antígeno; (2) la VH y la VL de los dos scFv diferentes podrían intercambiarse y no reconocer el objetivo o peor aún reconocer un antígeno inesperado e impredecible. Para la compuerta "O", el espaciador del primer CAR puede ser suficientemente diferente del espaciador del segundo CAR para evitar el emparejamiento cruzado. La secuencia de aminoácidos del primer espaciador puede compartir menos del 50%, 40%, 30% o 20% de identidad a nivel de aminoácidos con el segundo espaciador.

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

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

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 residuos 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/). Además, dado que el dominio transmembrana de una proteína es una estructura relativamente simple, es decir, una secuencia de polipéptidos que se predice que formará 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 derivarse de CD28, que proporciona una buena estabilidad del receptor.

Endodominio de activación

El endodominio es la porción de transmisión de señal de un CAR. Puede ser parte del CAR, o como parte de una molécula separada que se asocia con el CAR (dominios de unión a antígeno y transmembrana) intracelular para realizar su función de transmisión de señal. Después del reconocimiento de antígeno, los receptores se agrupan, los CD45 y CD148 nativos se excluyen de la sinapsis y se transmite una señal a la célula. El componente de endodominio

más utilizado es el de CD3-zeta que contiene 3 ITAM. Esto transmite una señal de activación a la célula T después de que se une el antígeno. CD3-zeta puede no proporcionar una señal de activación completamente competente y puede ser necesaria una señalización coestimuladora adicional. Por ejemplo, CD28 y OX40 quiméricos pueden usarse con CD3-Zeta para transmitir una señal proliferativa/de supervivencia, o los tres pueden usarse juntos.

En la "compuerta O" de la presente invención, la célula comprende dos CAR, cada uno de los cuales comprende o se asocia con un endodominio de activación. El endodominio de activación es capaz de transmitir tanto la señal inmunológica 1 como la señal inmunológica 2. Un endodominio no se considera "de activación" si solo comprende CD3ζ, que es suficiente para desencadenar la muerte de las células T de las células objetivo afines que no activa completamente las células T para proliferar y sobrevivir. Un "endodominio de activación" es un endodominio compuesto: en el que la parte intracelular de una molécula coestimuladora de células T se fusiona con la de CD3ζ dando como resultado un receptor de "segunda generación" que puede transmitir una señal de activación y coestimuladora simultáneamente después del reconocimiento de antígeno. El dominio coestimulador más utilizado es el de CD28. Esto proporciona la señal coestimuladora más potente, a saber, la señal inmunológica 2, que desencadena la proliferación de células T. Además de un dominio coestimulador, el endodominio activador también puede incluir endodominios de la familia de receptores de TNF, tales como los OX40 y 41BB estrechamente relacionados que transmiten señales de supervivencia.

Por lo tanto, un endodominio "de activación" puede no comprender el endodominio CD3-Zeta o el endodominio CD28 solo. Un endodominio de activación puede, por ejemplo, comprender el endodominio CD3-Zeta con el de CD28 u OX40 o el endodominio CD28 y el endodominio OX40 y CD3-Zeta.

Cada uno de los CAR en la compuerta O es independientemente capaz de activar las células T. Las células T se activan por lo tanto por la presencia de cualquier antígeno solo. Los dos CAR no son "complementarios" en el sentido de que la activación de ambos CAR es necesaria para proporcionar señales de activación y coestimuladoras.

Un endodominio que contiene un motivo ITAM puede actuar como un endodominio de activación en esta invención. Se sabe que varias proteínas contienen endodominios con uno o más motivos ITAM. Los ejemplos de tales proteínas incluyen la cadena épsilon 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, produciendo la firma YxxL/I. Típicamente, 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. Además, dado que el motivo es simple y no se requiere una estructura secundaria compleja, un experto en la materia puede diseñar polipéptidos que contengan ITAM artificiales para transmitir una señal de activación (véase el documento WO 2000063372, que se refiere a moléculas de señalización sintéticas).

El dominio de señalización de células T transmembrana e intracelular (endodominio) de un CAR con un endodominio de activación puede comprender la secuencia mostrada tal como la SEQ ID NO. 10, 11 o 12 o una variante de la misma que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia.

La SEQ ID NO. 10 comprende el dominio de transmembrana CD28 y el endodominio CD3 Z
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY

DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY

QGLSTATKDTYDALHMQALPPR

La SEQ ID NO. 11 comprende el dominio transmembrana CD28 y los endodominios CD28 y CD3 Zeta
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPP

RDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR

KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP

PR

La SEQ ID NO. 12 comprende el dominio transmembrana CD28 y los endodominios CD28, OX40 y CD3 Zeta
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPP

RDFAAYRSRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQG

QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG

MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Una secuencia variante puede tener al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia con 10, 11 o 12, siempre que la secuencia proporcione un dominio transmembrana efectivo y un dominio efectivo de señalización intracelular de células T.

Constructo de ácido nucleico

La presente invención proporciona un constructo de ácido nucleico que comprende la siguiente estructura:

A-X-B

en la cual

A y B son secuencias de ácido nucleico que codifican un primer receptor de antígeno quimérico (CAR) y un segundo CAR; y
X es una secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio de escisión,
en el que
el primer CAR y el segundo CAR reconocen diferentes antígenos;
el primer CAR y el segundo CAR comprenden cada uno un endodominio de activación; y el primer y/o segundo CAR comprende una señal de retención intracelular seleccionada del siguiente grupo: una señal de endocitosis; una señal de retención Golgi; una señal de reciclaje de la red trans-Golgi (TGN); una señal de retención del retículo endoplásmico (ER); y una señal de clasificación lisosómica.

La presente invención también proporciona constructos de ácido nucleico que comprenden A-X-B pero también expresan una o más proteínas de interés adicionales (POI). Por ejemplo, la presente invención proporciona un constructo de ácido nucleico que comprende la siguiente estructura:

A-X-B-Y-C

en la cual

A, B y C son secuencias de ácido nucleico que codifican un primer, segundo y tercer polipéptidos de interés (POI); y
X e Y son secuencias de ácido nucleico que pueden ser iguales o diferentes, cada una de las cuales codifica un sitio de escisión,
en el que al menos dos de los POI son receptores de antígeno quimérico (CAR) que comprenden una señal de retención intracelular.

Secuencias de ácido nucleico que codifican CAR

El constructo de ácido nucleico de la presente invención comprende dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican CAR.

La secuencia de ácido nucleico puede comprender la SEQ ID NO. 13, o una variante de la misma, con la adición de una o más secuencias que codifican secuencia o secuencias de retención intracelular.

SEQ ID NO. 13:
>MP13974.SFG.ACD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-HCH2CH3pvaa-CD28tmZw

ATGAGCCTGCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCC
AGACCAGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGAC
CGGGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTACC
AGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACA
GCGGCGTGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGCCTGACC
ATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACACCC
TGCCCTACACCTTCGGAGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACCAAGGCCGGAGGCGGAG
GCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGAGGT
GAAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCCTGGTGGCCCCAAGCCAGAGCCTGAGCGTGAC
CTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCC
CCCACGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTA
CAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGT
GTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAG
CACTACTACTATGGCGGCAGCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTG
ACCGTGAGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCC
ACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGG
GGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTTTTGGGTGCTGGT
GGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTT
TCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGG
GCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT
GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGA
GATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGG
GTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCC
TCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCC
CGGGCCCATGGCCGTGCCCACTCAGGTCCTGGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAGAT
GCCAGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTCGGAGA
TCGCGTCACCATCACCTGTCGAGCAAGTGAGGACATTTATTTTAATTTAGTGTGGTATCA
GCAGAAACCAGGAAAGGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGATACAAATCGCTTGGCAGAT
GGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCATAA
GTAGCCTGCAACCCGAAGATTTCGCAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGC
TCACGTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAG
GAGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGAGGCTCGAGATCTGAGGTG
CAGTTGGTGGAGTCTGGGGGCGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCC

TGTGCAGCCTCAGGATTCACTCTCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGGCTC
CAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTAT
CGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAAGCACCCTCT
ACCTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCACA
GGACGCTTATACGGGAGGTTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAGTC
TCGTCTATGGATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACTCACACATGCCCACCGT
GCCCAGCACCTCCCGTGGCCGGCCCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA
CACCCTCATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA
AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG
CAATGGGCAACCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGG
CTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTCT
GAGTCTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCCAAGTTCTGGGTCCTGGTGGTGGTGGGAGG
CGTGCTGGCCTGTTACTCTCTCCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCT
CCCGGGTGAAGTTTTCTCGCTCTGCCGATGCCCCAGCCTATCAGCAGGGCCAGAATCA
GCTGTACAATGAACTGAACCTGGGCAGGCGGGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGCG
GAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAACCACGGCGCAAAAATCCCCAGGAGG
GACTCTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAAATGGCCGAGGCCTATTCCGAGATCGGCAT
GAAGGGAGAGAGAAGACGCGGAAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGATTGTCCAC
CGCTACAAAAGATACATATGATGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCACCCAGATGA

La secuencia de ácido nucleico puede codificar la misma secuencia de aminoácidos que la codificada por la SEQ ID NO. 13, pero puede tener una secuencia de ácido nucleico diferente, debido a la degeneración del código genético. La secuencia de ácido nucleico puede tener al menos 80, 85, 90, 95, 98 o 99% de identidad con la secuencia mostrada como la SEQ ID NO. 13, siempre que codifique un primer CAR y un segundo CAR.

Sitio de escisión

El presente constructo de ácido nucleico comprende una secuencia que codifica un sitio de escisión colocado entre secuencias de ácido nucleico que codifican los primer y segundo CAR, de modo que el primer y el segundo CAR pueden expresarse como entidades separadas.

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

El término "escisión" se usa en este documento por conveniencia, pero el sitio de escisión puede hacer que el primer y el segundo CAR se separen en entidades individuales por un mecanismo distinto de la escisión clásica. Por ejemplo, para el péptido de auto-escisión del virus de la fiebre aftosa (FMDV) 2A (véase más abajo), se han propuesto varios modelos para explicar la actividad de "escisión": proteólisis por una proteinasa de células huésped, 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 propósitos de la presente invención, siempre que el sitio de escisión, cuando se coloca entre secuencias de ácido nucleico que codifican un primer y un segundo CAR, hace que el primer y segundo CAR se expresen como entidades separadas.

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

La furina es una enzima que pertenece a la familia de la proproteína convertasa de tipo subtilisina. Los miembros de esta familia son las convertasas de proproteína que procesan proteínas precursoras latentes en sus productos biológicamente activos. La furina es una serina endoproteasa dependiente de calcio que puede escindir eficientemente las 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 probeta-secretasa, la metaloproteinasa de matriz de membrana tipo 1, la subunidad beta del factor de crecimiento pronervioso y el factor de von Willebrand. La furina escinde proteínas justo después de una secuencia objetivo de aminoácidos básica (canónicamente, Arg-X-(Arg/Lys)-Arg') y se enriquece en el aparato de Golgi.

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

La proteasa de TEV es una cisteína proteasa altamente específica de secuencia que es proteasa de tipo quimotripsina. Es muy específica para su sitio de escisión objetivo 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 de TEV de consenso es ENLYFQ\S (en el que '\' denota el enlace peptídico escindido). Las células de mamíferos, tales como las células humanas, no expresan la proteasa de TEV. Por lo tanto, en realizaciones en las que el presente constructo de ácido nucleico comprende un sitio de escisión de TEV y se expresa en una célula de mamífero, la proteasa de TEV exógena también debe expresarse en la célula de mamífero.

El sitio de escisión puede codificar un péptido de auto escisión.

Un 'péptido de auto escisión' se refiere a un péptido que funciona de tal manera que cuando se produce el polipéptido que comprende el primer y el segundo CAR y el péptido de auto escisión, se "escinde" o se separa inmediatamente en un primer y segundo CAR distinto y discreto sin la necesidad de ninguna actividad de escisión externa.

El péptido de auto escisión puede ser un péptido 2A auto escindible de un aftovirus o un cardiovirus. La escisión primaria de 2A/2B de los aftovirus y cardiovirus está mediada por la "escisión" de 2A en su propio terminal C. En los aftovirus, tales 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 del terminal N de la proteína 2B (un residuo de prolina conservado) representa un elemento autónomo capaz de mediar la "escisión" en su propio terminal C.

Los 19 aminoácidos del terminal C de la proteína más larga del cardiovirus, junto con la prolina terminal N de 2B median la "escisión" con una eficiencia aproximadamente igual a la secuencia 2a del aftovirus FMDV. 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 involucrado en la actividad de "escisión" (Donelly et al., (2001) como anteriormente).

El sitio de escisión de la presente invención puede comprender la secuencia de aminoácidos: Dx_1Ex_2NPGP, en la que x_1 y x_2 son cualquier aminoácido. X_1 puede seleccionarse del siguiente grupo: I, V, M y S. X_2 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 que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Motivo	Presente en:
DIETNPGP (SEQ ID NO. 14)	Picornavirus EMCB, EMCD, EMCPV21
DVETNPGP (SEQ ID NO. 15)	Picornavirus MENGO y TMEBEAN; virus de insectos DCV, ABPV
DVEMNPGP (SEQ ID NO. 16)	Picornavirus TMEGD7 y TMEBEAN
DVESNPGP (SEQ ID NO. 17)	Picornavirus FMDA10, FMDA12, FMDC1, FMD01K, FMDSAT3, FMDVSAT2, ERAV; virus de insectos CrPV
DMESNPGP (SEQ ID NO. 18)	Picornavirus FMDV01G
DVELNPGP (SEQ ID NO. 19)	Picornavirus ERBV; rotavirus porcino
DVEENPGP (SEQ ID NO. 20)	Picornavirus PTV-1; virus de insectos TaV; Trypanosoma TSR1
DIELNPGP (SEQ ID NO. 21)	Rotavirus bovino, rotavirus humano
DIEQNPGP (SEQ ID NO. 22)	Endonucleasa AP de Trypanosoma
DSEFNPGP (SEQ ID NO. 23)	Secuencia bacteriana de *T. maritima*

El sitio de escisión, basado en una secuencia 2A puede tener, por ejemplo, 15-22 aminoácidos de longitud. La secuencia puede comprender el terminal C de una proteína 2A, seguido de un residuo de prolina (que corresponde a la prolina del terminal N 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, tener una, dos o tres sustituciones de aminoácidos, que retienen la capacidad de inducir la "escisión" de una secuencia de poliproteína en dos o más proteínas separadas.

La secuencia de escisión puede seleccionarse de entre las siguientes, que se ha demostrado que son activas hasta cierto punto (Donnelly et al., (2001) como anteriormente):

LLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO. 24)
LLNFDLLKLAGDVQSNPGP (SEQ ID NO. 25)
LLNFDLLKLAGDVEINPGP (SEQ ID NO. 26)
LLNFDLLKLAGDVEFNPGP (SEQ ID NO. 27)
LLNFDLLKLAGDVESHPGP (SEQ ID NO. 28)
LLNFDLLKLAGDVESEPGP (SEQ ID NO. 29)
LLNFDLLKLAGDVESQPGP (SEQ ID NO. 30)
LLNFDLLKLAGDVESNPGG (SEQ ID NO. 31)

Con base en la secuencia del motivo DxExNPGP, se han encontrado secuencias "similares a 2A" en picornavirus distintos de los aftovirus o cardiovirus, virus de insecto 'similares a picornavirus', rotavirus tipo C y secuencias repetidas dentro del *Trypanosoma spp* y una secuencia bacteriana (Donnelly et al., (2001) como anteriormente). El sitio de escisión puede comprender una de estas secuencias de tipo 2A, tales como:

YHADYYKQRLIHDVEMNPGP (SEQ ID NO. 32)
HYAGYFADLLIHDIETNPGP (SEC ID NO. 33)
QCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO. 34)
ATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO. 35)
AARQMLLLLSGDVETNPGP (SEQ ID NO. 36)
RAEGRGSLLTCGDVEENPGP (SEQ ID NO. 37)
TRAEIEDELIRAGIESNPGP (SEQ ID NO. 38)
TRAEIEDELIRADIESNPGP (SEQ ID NO. 39)
AKFQIDKILISGDVELNPGP (SEQ ID NO. 40)
SSIIRTKMLVSGDVEENPGP (SEQ ID NO. 41)
CDAQRQKLLLSGDIEQNPGP (SEQ ID NO. 42)
YPIDFGGFLVKADSEFNPGP (SEQ ID NO. 43)

El sitio de escisión puede comprender la secuencia similar a 2A mostrada como la SEQ ID NO. 37 (RAEGRGSLLTCGDVEENPGP).

Se ha demostrado que incluir una "extensión" del terminal N 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:

VTELLYRMKRAETYCPRPLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO. 44)
LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO. 45)
EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO. 46)
APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO. 47)

Señal de retención intracelular

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

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 a través de la secreción. Este proceso de suministro se lleva a cabo con base en la información de secuencia contenida en la proteína misma.

Las proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso (RE) 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 de la red de Golgi y trans-Golgi (TGN) a la membrana plasmática. Otras proteínas tienen señales dirigidas para su incorporación a orgánulos específicos de la vía exocítica, tal como los endosomas y los lisosomas.

Los lisosomas son orgánulos ácidos en los que las macromoléculas endógenas e internalizadas son degradadas por las hidolasas luminales. Las macromoléculas endógenas alcanzan el lisosoma al ser clasificadas en el TGN desde el cual son transportadas a los endosomas y luego a los lisosomas.

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 de Golgi
iii) señales de reciclaje de TGN
iv) señales de retención de ER
v) señales de clasificación lisosomales.

'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 una CAR equivalente u otra proteína transmembrana de control que no comprende una señal de retención intracelular.

En otras palabras, la proporción de CAR traducida 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 traducido de control equivalente u otra proteína transmembrana que no comprende una señal de retención intracelular.

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

Los constructos 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 equivalente de control u otra proteína transmembrana que no comprenda 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 microscopía de fluorescencia.

La señal de retención intracelular puede dirigir el CAR lejos de la ruta 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 lisosómico, endosómico 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 siguiendo 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 es 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 proteínas mismas.

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

Un endosoma es un compartimento unido a la membrana dentro de las células eucariotas. Es un compartimento de la vía de transporte de la membrana endocítica desde la membrana plasmática hasta el 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 le tome al material endocitosado llegar a ellos. La señal de retención intracelular usada en la presente invención puede dirigir la proteína a un compartimento endosómico tardío.

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

Existe un considerable conocimiento que ha surgido de 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 y Traub (2003) Ann. Rev. Biochem 72: 395-447; Braulke y Bonifacino (2009) Biochimica y Biophysica Acta 1793: 605-614; Griffith (2001) Current Biology 11: R226-R228; Mellman y Nelson (2008) Nat Rev Mol Cell Biol. 9: 833 -845; Dell'Angelica y Payne (2001) Cell 106: 395-398; Schafer et al., (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).

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.

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 si el terminal C está en el lado luminal o citoplasmático de la membrana (Goder y Spiess (2001) FEBS Lett 504: 87-93). Esto puede determinarse fácilmente considerando la posición de la señal de clasificación en su proteína natural.

Los ejemplos de señales de endocitosis incluyen los del receptor de transferrina y el receptor de asialoglicoproteína.

Los ejemplos de señales que causan el reciclaje del endosoma de TGN incluyen aquellas formas de proteínas tales como las CI-MPR y CD-MPR, sortilina, las proteínas relacionadas con el receptor de LDL LRP3 y LRP10 y la secretasa β, GGA1-3, LIMP-II, NCP1, mucolipina-1, sialina, GLUT8 y cadena invariante.

Los ejemplos de señales de retención de TGN incluyen las de las siguientes proteínas que están localizadas en el TGN: las enzimas de procesamiento de prohormonas furina, PC7, CPD y PAM; la glicoproteína E del virus del herpes 3 y TGN38.

Los ejemplos de señales de retención de ER incluyen señales del terminal C tales como KDEL, KKXX o KXKXX y el motivo RXR (R) de los canales de potasio. Las proteínas conocidas de ER incluyen la proteína E19 de adenovirus y ERGIC53.

Los ejemplos de señales de clasificación lisosomal incluyen las que se encuentran en las proteínas de membrana lisosómica, tales como LAMP-1 y LAMP-2, CD63, CD68, endolina, DC-LAMP, cistinosina, intercambiador de fosfato de azúcar 2 y fosfatasa ácida.

La señal de retención intracelular puede ser de la proteína E19 del adenovirus. La señal de retención intracelular puede ser de la proteína E3/19K, que también se conoce como E3gp de 19 kDa; E19 o GP19K. La señal de retención intracelular puede comprender la cola citosólica completa de E3/19K, que se muestra como la SEQ ID NO. 2; o los últimos 6 aminoácidos de esta cola, que se muestran como la SEQ ID NO. 3. Los presentes inventores han demostrado que los últimos 6 aminoácidos son particularmente importantes para la retención (Ejemplo 3 y Figura 5)

SEQ ID NO. 2: KYKSRRSFIDEKKMP
SEQ ID NO. 3: DEKKMP

Ajuste

La expresión relativa de uno o ambos CAR puede ajustarse mediante 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.

La opción a) se discute con más detalle a continuación.

Con respecto a la opción b), está disponible un intervalo de señales de retención intracelular de la gran cantidad de proteínas naturales que se clasifican en ubicaciones celulares distintas 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.

Una cascada de intensidad de señal está disponible, 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.

Cuando una señal de clasificación dirige una proteína al compartimento lisosómico, la proteína es internalizada y degradada por la célula, dando como resultado un escape relativamente pequeño a la superficie celular. La proteína se degrada y se pierde del sistema una vez que ingresa al lisosoma. Por lo tanto, las señales de clasificación lisosómica, como LAMP1, son las "más fuertes" en términos de reducción de la expresión relativa en la superficie celular.

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 de 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 celular.

Cuando una señal de clasificación dirige una proteína a los compartimentos endosómicos, Golgi o TGN, es probable que la proteína se recicle en cierta medida entre el TGN, el compartimento endosómico 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.

En general, la reducción en la expresión observada con señales de clasificación conocidas se puede resumir de la siguiente manera:

Señales de clasificación lisosómica > señales de retención/reciclaje de ER > señales de retención/reciclaje de TGN > señales de endocitosis.

La capacidad de ajuste usando diferentes señales de clasificación y/o diferentes posiciones de las 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, considérese un constructo de ácido nucleico que tiene la siguiente estructura:

A-X-B-Y-C

en la cual

A, B y C son secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos; y
X y Y son secuencias de ácido nucleico que codifican sitios de escisión.

El constructo de ácido nucleico codificará tres proteínas A, B y C, cualquiera de las cuales o todas 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 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 hace que una pequeña proporción de proteína B sea retenida en la célula (es decir, no se exprese en la superficie celular), y la secuencia de ácido nucleico C puede tener una señal de retención intracelular que hace que una gran proporción de proteína C se retenga en la célula.

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

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

Tipos de señalización

Numerosas proteínas que incluyen una señal de retención intracelular y se dirigen a un compartimento intracelular son conocidas en la técnica.

La señal de retención intracelular puede ser una señal de retención de una proteína que reside en el compartimento lisosómico, endosómico o 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).

La señal de retención intracelular puede ser una señal de clasificación basada en tirosina, una señal de clasificación basada en dileucina, una señal de agrupación ácida, una señal de evitación lisosómica, una señal de tipo NPFX'(1,2)D, una señal KDEL, una señal KKX'X' o una señal KX'KX'X' (en las que X' es cualquier aminoácido).

Las señales de clasificación basadas en tirosina median la rápida internalización de las proteínas transmembrana desde la membrana plasmática y el direccionamiento de las proteínas a los lisosomas (Bonifacino & Traub; como anteriormente). Los motivos de consenso NPX'Y e YX'X'Z' representan dos tipos de señales de clasificación basados en tirosina (en los que Z' es un aminoácido con una cadena lateral hidrofóbica voluminosa).

Se ha demostrado que las señales NPX'Y median la internalización rápida de las proteínas transmembrana de tipo I, se producen en familias tales como los miembros de las familias de proteínas precursoras del receptor LDL, integrina β y β-amiloide.

Se proporcionan ejemplos de señales de NPX'Y en la Tabla 7.

Tabla 7 - Señales de NPX'Y

Proteína	Especie	Secuencia
Receptor de LDL	Humana	Tm-10-INFD**NP**V**Y**QKTT-29
LRP1 (1)	Humana	Tm-21-VEIG**NP**T**Y**KMYE-64
LRP1 (2)	Humana	Tm-55-TNFT**NP**V**Y**ATLY-33
LRP1	*Drosophila*	Tm-43-GNFA**NP**V**Y**ESMY-38
LRP1 (1)	*C. elegans*	Tm-54-TTFT**NP**V**Y**ELED-91
LRP1 (2)	*C. elegans*	Tm-140-LRVD**NP**L**Y**DPDS-4
Megalina (1)	Humana	Tm-70-IIFE**NP**M**Y**SARD-125
Megalina (2)	Humana	Tm-144-TNFE**NP**I**Y**AQME-53
Integrina 13-1 (1)	Humana	Tm-18-DTGE**NP**I**Y**KSAV-11
Integrina 13-1 (2)	Humana	Tm-30-TTVV**NP**K**Y**EGK
Integrina 13 (1)	*Drosophila*	Tm-26-WDTE**NP**I**Y**KQAT-11
Integrina 13 (2)	*Drosophila*	Tm-35-STFK**NP**M**Y**AGK
APLP1	Humana	Tm-33-HGYE**NP**T**Y**RFLE-3
APP	Humana	Tm-32-NGYE**NP**T**Y**KFFE-4
Tipo APP	*Drosophila*	Tm-38-NGYE**NP**T**Y**KYFE-3
Receptor de insulina	Humana	Tm-36-YASS**NP**E**Y**LSAS-379
Receptor de EGR (1)	Humana	Tm-434-GSVQ**NP**V**Y**HNQP-96
Receptor de EGR (2)	Humana	Tm-462-TAVG**NP**E**Y**LNTV-68
Receptor de EGR (3)	Humana	Tm-496-ISLD**NP**D**Y**QQDF-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 residuos clave se indican en negrita. Se indican los números de aminoácidos antes (es decir, terminal amino) y después (es decir, terminal carboxilo) de las señales. Abreviaturas: Tm, transmembrana; LDL, lipoproteína de baja densidad; LRP1, proteína 1 relacionada con el receptor de LDL; APP, proteína precursora del amiloide 13; APLP1, proteína 1 similar a APP.

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 tales como el CI-MPR y CD-MPR, proteínas de membrana lisosómica tales como LAMP-1 y LAMP-2, y proteínas TGN tales como TGN38 y furina, así como en proteínas localizadas en orgánulos especializados endosomales-lisosomales 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 la 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 los orgánulos relacionados con los lisosomas.

En la Tabla 8 se proporcionan ejemplos de señales de tipo YX'X'Z'.

Tabla 8 - Señales de tipo YX'X'Z'

Proteína	Especie	Secuencia
LAMP-1	Humana	Tm-RKRSHAG**Y**QT**I**
LAMP-2a	Humana	Tm-KHHHAG**Y**EQ**F**
LAMP-2a	Pollo	Tm-KKHHNTG**Y**EQ**F**
LAMP-2b	Pollo	Tm-RRKSRTG**Y**QS**V**
LAMP-2c	Pollo	Tm-RRKSYAG**Y**QT**L**
LAMP	*Drosophila*	Tm-RRRSTSRG**Y**MS**F**
LAMP	Lombriz	Tm-RKRSRRG**Y**ES**V**
CD63	Humana	Tm-KSIRSG**Y**EV**M**
GMP-17	Humana	Tm-HCGGPRPG**Y**ET**L**
GMP-17	Ratón	Tm-HCRTRRAE**Y**ET**L**

(continuación)

Proteína	Especie	Secuencia
CD68	Humana	Tm-RRRPSA**Y**QA**L**
CDlb	Humana	Tm-RRRS**Y**QN**I**P
CDlc	Humana	Tm-KKHCS**Y**QD**I**L
CDld	Ratón	Tm-RRRSA**Y**QD**I**R
CD1	Rata	Tm-RKRRRS**Y**QD**I**M
Endolina	Rata	Tm-KFCKSKERN**Y**HT**L**
Endolina	*Drosophila*	Tm-KFYKARNERN**Y**HT**L**
TSC403	Humana	Tm-KIRLRCQSSG**Y**QR**I**
TSC403	Ratón	Tm-KIRQRHQSSA**Y**QR**I**
Cistinosina	Humana	Tm-HFCLYRKRPG**Y**DQ**L**N
Portador putativo de soluto	humana	Tm-12-SLSRGSG**Y**KE**I**
TRP-2	Humana	Tm-RRLRKG**Y**TP**L**MET-11
HLA-DM ◆	Humana	Tm-RRAGHSS**Y**TP**L**PGS-9
LmpA	Dictyostelium	Tm-KKLRQQKQQG**Y**QA**I**INNE
Proteína lisosómica putativa	Dictyostelium	Tm-RSKSNQNQS**Y**NL**I**QL
LIMP-II	Dictyostelium	Tm-RKTFYNNNQ**Y**NGYN**I**IN
Receptor de transferrina	Humana	16-PLS**Y**TR**F**SLA-35-Tm
receptor H1de asialoglicoproteína	Humana	MTKE**Y**QD**L**QHL-29-Tm
CI-MPR	Humana	Tm-22-SYTC**Y**SK**V**NKE-132
CD-MPR	Humana	Tm-40-PAA**Y**RG**V**GDD-16
CTLA-4	Humana	Tm-10-TGV**Y**VK**M**PPT-16
Furina	Humana	Tm-17-LIS**Y**KG**L**PPE-29
TGN38	Rata	Tm-2 3-ASD**Y**QR**L**NLKL
gp41	VIH-1	Tm-13-RQG**Y**SP**L**SFQT-144
Fosfatasa ácida	Humana	Tm-RMQAQPPG**Y**RH**V**ADGEDHA

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'X'LL[LI]) desempeñan papeles críticos en la clasificación de muchas proteínas transmembrana de tipo I, tipo II y multiexpansión. Las señales de clasificación basadas en dileucina están involucradas en la internalización rápida y degradación lisosómica de las proteínas transmembrana y en el direccionamiento de las 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.

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

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

Proteína	Especie	Señal
CD3-Y	Humana	Tm-8-S**D**KQT**LL**PN-26
LIMP-II	Rata	Tm-11-D**E**RAP**LI**RT
Nmb	Humana	Tm-37-Q**E**KDP**LL**KN-7
QNR-71	Codorniz	Tm-37-T**E**RNP**LL**KS-5
Pme117	Humana	Tm-33-G**E**NSP**LL**SG-3
Tirosinasa	Humana	Tm-8-E**E**KQP**LL**ME-12
Tirosinasa	Pez medaka	Tm-16-G**E**RQP**LL**QS-13
Tirosinasa	Pollo	Tm-8-P**E**IQP**LL**TE-13
TRP-1	Pez dorado	Tm-7-E**G**RQP**LL**GD-15
TRP-1	Humana	Tm-7-E**A**NQP**LL**TD-20
TRP-1	Pollo	Tm-7-E**L**HQP**LL**TD-20
TRP-2	Pez cebra	Tm-5-R**E**FEP**LL**NA-11
VMAT2	Humana	Tm-6-E**E**KMA**IL**MD-29
VMAT1	Humana	Tm-6-E**E**KLA**IL**SQ-32
VAchT	Ratón	Tm-10-S**E**RDV**LL**DE-42
VAMP4	Humana	19-S**E**RRN**LL**ED-88-Tm
FcR neonatal	Rata	Tm-16-D**D**SGD**LL**PG-19
CD4	Humana	Tm-12-S**Q**IKR**LL**SE-17
CD4	Gato	Tm-12-S**H**TKR**LL**SE-17
GLUT4	Ratón	Tm-17-R**R**TPS**LL**EQ-17
GLUT4	Humana	Tm-17-H**R**TPS**LL**EQ-17

(continuación)

Proteína	Especie	Señal
IRAP	Rata	46-EP**R**GSR**LL**VR-53-Tm
Ii	Humana	MD**D**QRD**LI**SNNEQLP**ML**GR-11-Tm
Ii	Ratón	MD**D**QRD**LI**SNHEQLP**IL**GN-10-Tm
Ii	Pollo	MAE**E**QRD**LI**SSDGSSG**VL**PI-12-Tm
Ii-1	Pez cebra	MEPDH**Q**NES**LI**QRVPSAET**IL**GR-12Tm
Ii-2	Pez cebra	MSSEG**NE**TP**LI**SDQSSVNvAGPQP-8-Tm
Lamp	Trypanosoma	Tm-RPRRRT**E**EDE**LL**PEEAEG**LI**DPQN
Proteína de Menkes	Humana	Tm-74-P**D**KHS**LL**VGDFREDDDTAL
NPC1	Humana	Tm-13-T**E**RER**LL**NF
AQP4	Humana	Tm-32-V**E**TDD**LI**L-29
RME-2	*C. elegans*	Tm-104-F**E**NDS**LL**
Vam3p	*S. cerevisiae*	153-N**E**QSP**LL**HN-121-Tm
ALP	*S. cerevisiae*	7-S**E**QTR**LV**P-18-Tm
Gap1p	*S. cerevisiae*	Tm-23-E**V**QLD**LL**K-24

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

Las señales de 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 el TGN y los endosomas, tales como el CI-MPR y CD-MPR, sortilina, las proteínas LRP3 y LRP10 relacionadas con el receptor de LDL y la β-secretasa.

En la Tabla 10 se proporcionan ejemplos de señales de clasificación DX'X'LL.

Tabla 10 - Señales de clasificación DX'X'LL

Proteína	Especie	Secuencia
CI-MPR	Humana	Tm-151-SFHDDS**D**ED**LL**HI
CI-MPR	Bovino	Tm-150-TFHDDS**D**ED**LL**HV
CI-MPR	Conejo	Tm-151-SFHDDS**D**ED**LL**NI
CI-MPR	Pollo	Tm-148-SFHDDS**D**ED**LL**NV
CD-MPR	Humana	Tm-5 4-EESEER**D**DH**LL**PM
CD-MPR	Pollo	Tm-54-DESEER**D**DH**LL**PM
Sortilina	Humana	Tm-41-GYHDDS**D**ED**LL**E
SorLA	Humana	Tm-41-1TGFSD**D**VP**MV**IA
BP activadora de cabeza	Hidra	Tm-41-INRFSD**D**EP**LV**VA
LRP3	Humana	Tm-237-MLEASD**D**EA**LL**VC
ST7	Humana	Tm-330-KNETSD**D**EA**LL**LC
LRP10	Ratón	Tm-235-WWEAEDEP**LL**A
LRP10	Humana	Tm-237-WVAEAE**D**EP**LL**T
Beta-secretasa	humana	Tm-9-HDDFA**D**DIS**LL**K
Mucolipina-1	Ratón	Tm-4 3-GRDSPE**D**HS**LL**VN
MHC-I no clásico	Ratón ciervo	Tm-6-VRCHPE**D**DR**LL**G
FLJ30532	Humana	Tm-8 3-HRVSQD**D**LD**LL**TS
GGA1	Humana	350-ASVSLLD**D**E**LM**SL -275
GGA1	Humana	415-ASSGLD**D**LD**LL**GK-211
GGA2	Humana	408-VQNPSA**D**RN**LL**DL-192
GGA3	Humana	384-NALSWL**D**EE**LL**CL-326
GGA	*Drosophila*	447-TVDSID**D**VP**LL**SD -116

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

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

En la Tabla 11 se proporcionan ejemplos de señales de conglomerados ácidos.

Tabla 11 - Señales de clasificación de conglomerados ácidos

Proteína	Especie	Secuencia
Furina	Ratón	Tm-31-Q**EE**CPS**D**S**EED**EG-14
PC6B (1)[a]	Ratón	m-39-R**D**R**D**Y**DEDDEDD**I-36

(continuación)

Proteína	Especie	Secuencia
PC6B (2)	Ratón	Tm-69-L**DE**T**EDDE**L**E**Y**DDE**S-4
PC7	Humana	Tm-38-K**D**P**DE**V**E**T**E**S-47
CPD	Humana	Tm-36-H**E**FQ**DE**T**D**T**EEET**-6
PAM	Humana	Tm-59-Q**E**K**EDD**GS**E**S**EEE**Y-12
VMAT2	Humana	Tm-35G**EDEE**S**E**S**D**
VMAT1	Humana	Tm-3 5-G**ED**S**DEE**P**D**H**EE**
VAMP4	Humana	25-L**EDD**S**DEEED**F-81-Tm
Glicoproteína B	HCMV	Tm-125-K**D**S**DEEE**NV
Glicoproteína E	Virus del herpes 3	Tm-28-F**ED**S**E**ST**D**T**EEE**F-21
Nef	HIV-1 (AAL65476)	55-L**E**AQ**EEEE**V-139
Kex1p (1)	*S. cerevisiae*	Tm-29-A**DD**L**E**SGLGA**ED**DL**E**Q**DE**Q**LE**G-40
Kex1p (2)	*S. cerevisiae*	Tm-79-T**E**I**DE**SF**E**MT**D**F
Kex2p	*S. cerevisiae*	Tm-36-T**E**P**EE**V**ED**F**D**FD**D**L**S**DED**H-61
Vps10p	*S. cerevisiae*	Tm-112-F**E**I**EEDD**VPTL**EEE**H-37

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

[a] El número entre paréntesis es el número de motivo.

El receptor de KDEL une la proteína en el compartimento intermedio ER-Golgi, o en el Golgi temprano y los retorna al ER. Aunque la señal común de los mamíferos es KDEL, se ha demostrado que el receptor de 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.

Las señales KKX'X 'y KX'KX'X' son señales de recuperación que pueden colocarse en el lado citoplasmático de una proteína de membrana de tipo I. Los requisitos de secuencia de estas señales son proporcionan en detalle por Teasdale y 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, LZX'Z[DE], LLDLL, PWDLW, KDEL, HDEL, KKX'X' o KX'KX'X'; en las que X' es cualquier aminoácido y Z' es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba voluminosa.

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

TYRP1 es una proteína melansomal 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 (1-477 aa), un dominio transmembrana (478-501) y un dominio citoplasmático (502-537). Una señal de dileucina que reside en el dominio citoplasmático provoca la retención de la proteína. Esta señal de dileucina tiene la secuencia mostrada como la SEQ ID NO. 1 (NQPLLTD).

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.

La señal de retención intracelular puede ser proximal al dominio transmembrana, por ejemplo, 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 el "ajuste" de la expresión relativa de dos proteínas. Por ejemplo, en el caso del motivo dileucina TYRP1, 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

Cualquiera o la totalidad de A o B; o A, B o C de las secuencias de ácido nucleico en los constructos definidos en el presente documento pueden codificar un CAR que puede comprender o no una señal de retención intracelular.

El constructo de ácido nucleico puede comprender una o más secuencias de ácido nucleico adicionales que codifican el polipéptido de interés (POI). Por ejemplo, el o 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.

Gen suicida/marcador

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

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

Se conocen varios genes suicidas y marcadores en la técnica. El documento WO2013/153391 describe un polipéptido compacto que comprende tanto una fracción marcadora como una fracción suicida. El polipéptido puede coexpresarse con un transgén terapéutico, tal como un gen que codifica un CAR.

La fracción marcadora comprende un epítopo mínimo de CD34 que permite la selección eficiente de células transducidas usando, por ejemplo, el sistema CliniMACS Miltenyi CD34.

La fracción suicida comprende un epítopo mínimo basado en el epítopo de CD20. Las células que expresan un polipéptido que comprende esta secuencia pueden destruirse selectivamente usando un anticuerpo lítico tal como Rituximab.

El marcador combinado y el polipéptido suicida se expresan de manera estable en la superficie celular después, por ejemplo, de la transducción retroviral de su secuencia codificante.

El polipéptido marcador/suicida puede tener la fórmula:

St-R1-S1-Q-S2-R2

en la que

St es una secuencia de tallo que, cuando el polipéptido se expresa en la superficie de una célula objetivo, 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 epítopo de unión a QBEnd10.

El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada como la SEQ ID NO. 48, o una variante de la misma que tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia mostrada como la SEQ ID NO. 48 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 de la célula mediada por el complemento en presencia de Rituximab.

CPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLCSGGGGSPAPRPP
TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHR
NRRRVCKCPRPVV (SEQ ID No. 48)

La presente invención proporciona un método para eliminar una célula que expresa dicho gen marcador/suicida, que comprende la etapa de exponer las células a rituximab.

Célula

La presente invención se refiere a una célula que coexpresa un primer CAR y un segundo CAR en la superficie celular. La célula expresa un constructo 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.

En particular, la célula puede ser una célula efectora inmune tal como una célula T o una célula asesina natural (NK).

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

Las células T auxiliares (células TH) ayudan a otros glóbulos blancos en los procesos inmunológicos, incluida la maduración de células B en células plasmáticas y células B de memoria, y la activación de células T citotóxicas y macrófagos. Las células TH expresan CD4 en su superficie. Las células TH se activan cuando son presentadas con antígenos peptídicos por moléculas del MHC clase II en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Estas células pueden diferenciarse en uno de varios subtipos, incluidos TH1, TH2, TH3, TH17, Th9 o TFH, que secretan diferentes citocinas para facilitar diferentes tipos de respuestas inmunes.

Las células T citotóxicas (células TC o CTL) destruyen las células infectadas por virus y las células tumorales, y también están implicadas en el rechazo del trasplante. Las CTL expresan el CD8 en su superficie. Estas células reconocen sus objetivos al unirse al antígeno asociado con el MHC clase I, que está presente en la superficie de todas las células nucleadas. A través de la IL-10, la adenosina y otras moléculas secretadas por las células T reguladoras, las células CD8+ pueden inactivarse a un estado anérgico, que previene enfermedades autoinmunes tales como la encefalomielitis autoinmune experimental.

Las células T de memoria son un subconjunto de células T específicas de antígeno que persisten a largo plazo después de que se resuelve una infección. Se expanden rápidamente a un gran número de células T efectoras al volver a exponerse a su antígeno afín, proporcionándole así al sistema inmunitario "memoria" contra infecciones pasadas. Las células T de memoria comprenden tres subtipos: células T de memoria central (células TCM) y dos tipos de células T efectoras de memoria (células TEM y células TEMRA). Las células de memoria pueden ser CD4+ o CD8+. Las células T de memoria típicamente expresan la proteína de la superficie celular CD45RO.

Las células T reguladoras (células Treg), anteriormente conocidas como células T supresoras, son cruciales para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Su función principal es apagar la inmunidad mediada por células T hacia el final de una reacción inmune y suprimir las células T autorreactivas que escaparon al proceso de selección negativa en el timo.

Se han descrito dos clases principales de células Treg CD4+: células Treg de origen natural y células Treg adaptativas.

Las células Treg de origen natural (también conocidas como células Treg CD4+CD25+FoxP3+) surgen en el timo y se han relacionado con interacciones entre las células T en desarrollo con células dendríticas mieloides (CD11c+) y plasmacitoides (CD123+) que se han activado con TSLP. Las células Treg de origen natural se pueden distinguir de otras células T por la presencia de una molécula intracelular llamada FoxP3. Las mutaciones del gen FOXP3 pueden prevenir el desarrollo de células T reguladoras, causando la enfermedad autoinmune fatal IPEX.

Las células Treg adaptativas (también conocidas como células Tr1 o células Th3) pueden originarse durante una respuesta inmune normal.

Las células T de la invención pueden ser cualquiera de los tipos de células T mencionados anteriormente, en particular una CTL.

Las células asesinas naturales (NK) son un tipo de célula citolítica que forma parte del sistema inmune innato. Las células NK proporcionan respuestas rápidas a las señales innatas de las células infectadas por virus de manera independiente del MHC

Las células NK (que pertenecen al grupo de 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 las células NK se diferencian y maduran en la médula ósea, los ganglios linfáticos, el bazo, las amígdalas y el timo, donde luego entran en la circulación.

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

Las células que expresan CAR, tales como las células T o NK que expresan CAR, pueden crearse *ex vivo* a partir de la sangre periférica del propio paciente (primera parte), o en el contexto de un trasplante de células madre hematopoyéticas de sangre periférica del donante (segunda parte) o sangre periférica de un donante no conectado (tercera parte).

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

Alternativamente, 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, tal como células T. Alternativamente, se puede usar una línea celular inmortalizada tal como una línea de células T que retiene su función lítica y podría actuar como un agente terapéutico.

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

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

Una célula T de CAR de la invención puede elaborarse mediante:

(i) aislamiento de una muestra que contiene células T de un sujeto u otras fuentes enumeradas anteriormente; y
(ii) transducción o transfección de las células T con un constructo de ácido nucleico que codifica el primero y segundo CAR.

Las células T pueden entonces purificarse, por ejemplo, seleccionarse en base a la coexpresión del primer y segundo CAR.

Vector

La presente invención también proporciona un vector que comprende un constructo de ácido nucleico que codifica CAR como se define en el presente documento. Tal vector puede usarse para introducir la secuencia o secuencias de ácido nucleico en una célula huésped 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 ser capaz de transfectar o transducir una célula T.

Composición farmacéutica

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene una pluralidad de células que expresan CAR, tales como células T o células 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. Tal 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 matar células objetivo, tales como células cancerosas. La célula objetivo puede ser reconocible por un patrón definido de expresión de antígeno, por ejemplo, la expresión de antígeno A O 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 inmunes patógenas, por ejemplo en enfermedades autoinmunes, alergias y rechazo de injerto contra huésped.

Las células de la invención pueden usarse 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 Hodgkin, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de tiroides.

Son particularmente adecuadas para el tratamiento de tumores sólidos donde la disponibilidad de buenos objetivos individuales selectivos es limitada.

Las células de la invención pueden usarse para tratar: cánceres de la cavidad oral y la faringe que incluye cáncer de lengua, boca y faringe; cánceres del sistema digestivo que incluye cánceres esofágico, gástrico y colorrectal; 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 los uréteres o la vejiga; cánceres cerebrales que incluyen gliomas, glioblastoma multiforme y medulobastomas; 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 plasmacitomas; 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 enfoques estándar.

Método

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para modular la expresión relativa de la superficie celular de dos CAR expresados a partir de un único constructo de ácido nucleico; al incluir una señal de retención intracelular, una o ambas secuencias de ácido nucleico que codifican el o los CAR.

La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de ejemplos, que están destinados a servir para ayudar a un experto en la técnica a llevar a cabo la invención y no pretenden de ninguna manera limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Creación de poblaciones de células objetivo

Con el propósito de diseñar y probar una compuerta O, 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, ya sea individual o doblemente, para establecer células negativas para ambos antígenos (el tipo silvestre), positivas para cualquiera y positivas para ambas. Los datos de expresión se muestran en la Figura 3.

Ejemplo 2 - Diseño y función de la compuerta O

Para construir la compuerta O, se coexpresaron un par de receptores que reconocen CD19 y CD33. Se usaron diferentes espaciadores para evitar el emparejamiento cruzado. Ambos receptores tenían un dominio transmembrana derivado de CD28 para mejorar la estabilidad de la superficie y un endodominio derivado del CD3 Zeta para proporcionar una señal de activación simple. De esta forma, se coexpresaron un par de CAR independientes de 1ª generación. El casete del vector retroviral utilizado para coexpresar las secuencias utiliza un péptido autoescindible 2A de aftosa para permitir la coexpresión 1:1 de ambos receptores. El diseño del casete se muestra en la Figura 4, y las estructuras de proteínas en la Figura 5. La secuencia de nucleótidos de las regiones homólogas eran de codón desplazado para evitar la recombinación durante la transcripción inversa del vector retroviral.

Ejemplo 3 - Prueba de la compuerta O

La expresión de ambos CAR se probó en la superficie de las células T mediante tinción con el antígeno afín fusionado con Fc. Mediante el uso de diferentes especies de dominios Fc (ratón para CD19 y conejo para CD33), se determinó la coexpresión de ambos CAR en la superficie celular mediante tinción con diferentes anticuerpos secundarios conjugados con diferentes fluoróforos. Esto se muestra en la Figura 6.

Las pruebas funcionales se llevaron a cabo utilizando la línea de células T de ratón BW5147. Esta línea celular libera IL2 tras la activación, lo que permite una lectura cuantitativa simple. Estas células T se cultivaron conjuntamente con cantidades crecientes de las células objetivo artificiales descritas anteriormente. Las células T respondieron a las células objetivo que expresaban cualquier antígeno, como se muestra por la liberación de IL2 medida por ELISA. Se demostró que ambos CAR se expresaban en las superficies celulares y que las células T respondían a uno o ambos antígenos. Estos datos se muestran en la Figura 7.

Ejemplo 4 - Disección de señales de retención lisosomal TYRP1

La capacidad de la señal de retención de la proteína relacionada con la tirosinasa-1 (TYRP1) para causar la retención de un polipéptido cuando en el contexto de un endodominio más complejo se determinó usando varios constructos (Figura 9). El constructo de tipo silvestre se comparó con los constructos en los que la proteína fluorescente verde mejorada (eGFP) se añadió o reemplazó al endodominio 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.

Todos los constructos se coexpresan con IRES.CD34. La tinción de células SupT1 transducidas se muestra con tinción intracelular y superficial en la Figura 9.

Se encontró que el reemplazo del endodominio dio como resultado una expresión superficial muy brillante, la introducción de eGFP después de la señal de retención a casi ninguna expresión superficial y la introducción antes de la señal de retención a la expresión superficial intermedia (Figura 9).

Ejemplo 5 - 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 de CAR de manera que una de las proteínas de CAR tenía 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 de CAR original no modificada.

Las PBMC se aislaron de sangre y se estimularon usando PHA e IL-2. Dos días después, las células se transdujeron en placas recubiertas con retronectina con retrovirus que contenía el constructo de CAR CD19:CD33. El día 5, el nivel de expresión de los dos CAR traducidos por el constructo se evaluó mediante citometría de flujo y las células se agotaron de células CD56+ (predominantemente células NK). En el día 6, las PBMC se colocaron en un cocultivo con células objetivo a una relación 1:2 de efector CON RESPECTOP a LA célula objetivo. El día 8 se recogió el sobrenadante y se analizó la secreción de IFN-gamma mediante ELISA.

El patrón observado con las fusiones Tyrp1-eGFP se observó con 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 se esperaba, la expresión de la segunda proteína transmembrana del casete no se alteró (Figura 10).

Ejemplo 6 - Modulación de la expresión usando una señal de retención de la proteína E3/19K adenoviral

La proteína E3/19K de adenovirus humano es una glicoproteína 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 cadena 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. Más específicamente, 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 de CAR, como se describe en el Ejemplo 5, de modo que una de las proteínas de CAR tenía el motivo de retención de la proteína E3/19K de adenovirus. En este experimento, el motivo de retención del segundo CAR en el casete de expresión (el CAR inhibidor anti-CD33).

Se generaron constructos que comprendían la cola citosólica completa de la proteína E3/19K de adenovirus o solo los últimos 6 aa de E3/19K (DEKKMP), que se encontraron críticos para su capacidad de retención de Golgi/ER (Figura 11). Estos constructos se transfectaron en células 293T y se tiñeron principalmente con proteínas Fc de conejo de CD19 quimérico soluble y de Fc de ratón de CD33 quimérico soluble. Posteriormente, estas células se tiñeron con un Fc-FITC anti-conejo y un Fc-APC anti-ratón (Figura 12). Estas células muestran una retención clara cuando la proteína E3/19K de adenovirus de longitud completa, o el motivo DEKKMP, se colocó en el receptor anti-CD33 pero no tuvo efecto sobre los niveles de expresión del receptor anti-CD19.

Ejemplo 7 - Modulación de la expresión alterando el péptido de señalización: intercambio en la secuencia señal V-III de la cadena kappa de Ig murina

El documento PCT/GB2014/053452 describe un sistema de vector que codifica dos receptores de antígeno quimérico (CAR), uno contra CD19 y otro contra CD33. El péptido de señalización utilizado para los CAR en ese estudio fue el péptido de señalización de la secuencia señal CD8a humano. Para los propósitos de este estudio, este fue sustituido con el péptido de señalización de la región V-III de la cadena kappa de Ig murina, que tiene la secuencia: METDTLILWVLLLLVPGSTG (residuos hidrófobos resaltados en negrita). Para establecer que la secuencia señal V-III de la cadena kappa de Ig murina funcionaba tan bien como la secuencia señal de CD8a humano, se realizó un estudio comparativo. Para ambas secuencias señal, se observó la expresión funcional del CAR anti-CD33 y el CAR anti-CD19. Esta secuencia 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 quimérico soluble fusionado con la cadena Fc de conejo como con CD33 quimérico soluble fusionado con la cadena Fc de ratón. Todas las células se tiñeron entonces con Fc-FITC anti-conejo y Fc-APC anti-ratón. Las gráficas de citometría de flujo muestran la secuencia señal sustituida como una comparación con secuencias señal no transfectadas (NT) y el constructo con Cd8 (Figura 15). Se encontró que la secuencia señal de V-III de la cadena kappa de Ig murina funcionaba tan bien como la secuencia señal de CD8a humano.

Ejemplo 8 - Alteración de la expresión relativa mediante la eliminación de residuos hidrófobos en el péptido de señalización.

Los residuos hidrófobos se eliminaron de forma gradual y se observó el efecto sobre la expresión relativa del CAR anti-CD33 y el CAR anti-CD19. Se investigó el efecto de las eliminaciones de uno, dos, tres y cuatro aminoácidos y los resultados se muestran en las Figuras 16 a 19, respectivamente.

Todas los constructos 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 de CAR anti-CD19 fue mayor con un mayor número de eliminaciones de aminoácidos de 1 a 3, pero luego se estabilizó (cuatro eliminaciones produjeron una disminución similar en la expresión que tres eliminaciones).

Listado de secuencias

<110> UCL Business PLC

<120> Constructo de ácido nucleico

<130> P106291PCT

<150> GB1507111.1
<151> 2015-04-27

<160> 233

<170> PatentIn versión 3.5

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

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

<400> 1

Asn Gln Pro Leu Leu Thr Asp
1 5

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

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

<400> 2

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

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

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

<400> 3

Asp Glu Lys Lys Met Pro
1 5

<210> 4
<211> 1129
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Compuerta O de CAR que reconoce CD19 O CD33

<400> 4

```
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
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

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

```
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 Phe Trp Val Leu
            980                 985                 990
```

```
Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala  Cys Tyr Ser Leu Leu  Val Thr Val
        995                 1000                1005

Ala Phe  Ile Ile Phe Trp Val  Arg Ser Arg Val Lys  Phe Ser Arg
    1010                1015                1020

Ser Ala  Asp Ala Pro Ala Tyr  Gln Gln Gly Gln Asn  Gln Leu Tyr
    1025                1030                1035

Asn Glu  Leu Asn Leu Gly Arg  Arg Glu Glu Tyr Asp  Val Leu Asp
    1040                1045                1050

Lys Arg  Arg Gly Arg Asp Pro  Glu Met Gly Gly Lys  Pro Arg Arg
    1055                1060                1065

Lys Asn  Pro Gln Glu Gly Leu  Tyr Asn Glu Leu Gln  Lys Asp Lys
    1070                1075                1080

Met Ala  Glu Ala Tyr Ser Glu  Ile Gly Met Lys Gly  Glu Arg Arg
    1085                1090                1095

Arg Gly  Lys Gly His Asp Gly  Leu Tyr Gln Gly Leu  Ser Thr Ala
    1100                1105                1110

Thr Lys  Asp Thr Tyr Asp Ala  Leu His Met Gln Ala  Leu Pro Pro
    1115                1120                1125

Arg
```

<210> 5
<211> 234
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 5

```
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

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
```

<210> 6
<211> 46
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia espaciadora, tallo CD8 humano

<400> 6

```
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

<210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia espaciadora, bisagra 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

Lys Asp Pro Lys
20

<210> 8
<211> 185
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia espaciadora, ectodominio CD2

<400> 8

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
```

<210> 9
<211> 259
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia espaciadora, ectodominio CD34
<400> 9

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

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> 10
<211> 140
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> que comprende el dominio transmembrana CD28 y el endodominio CD3 Z

<400> 10

```
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> 11
<211> 180
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> que comprende el domino transmembrana CD28 y los endodominios CD28 y CD3 Zeta

<400> 11

```
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

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> 12
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> que comprende el domino transmembrana CD28 y los endodominios CD28, OX40 y CD3 Zeta

<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 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 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> 13
<211> 3390
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> MP13974.SFG.aCD19fmc63-CD8STK-CD28tmZ-2A-aCD33glx-HCH2CH3pvaa-CD2 8tmZw

<400> 13

atgagcctgc ccgtgaccgc cctgctgctg cccctggccc tgctgctgca cgccgccaga 60

ccagacatcc agatgaccca gaccaccagc agcctgagcg ccagcctggg cgaccgggtg 120

accatcagct gcagagccag ccaggacatc agcaagtacc tgaactggta ccagcagaag 180

cccgacggca ccgtgaagct gctgatctac cacaccagcc ggctgcacag cggcgtgccc 240

agccggttca gcggcagcgg cagcggcacc gactacagcc tgaccatcag caacctggag 300

caggaggaca tcgccaccta cttctgccag cagggcaaca ccctgcccta caccttcgga 360

ggcggcacca agctggagat caccaaggcc ggaggcggag gctctggcgg aggcggctct 420

ggcggaggcg gctctggcgg aggcggcagc gaggtgaagc tgcaggagtc tggcccaggc 480

ctggtggccc caagccagag cctgagcgtg acctgcaccg tgagcggcgt gagcctgccc 540

gactacggcg tgagctggat caggcagccc ccacggaagg gcctggagtg gctgggcgtg 600

atctggggca gcgagaccac ctactacaac agcgccctga agagccggct gaccatcatc 660

aaggacaaca gcaagagcca ggtgttcctg aagatgaaca gcctgcagac cgacgacacc 720

gccatctact actgcgccaa gcactactac tatggcggca gctacgctat ggactactgg 780

ggccagggca ccagcgtgac cgtgagctca gatcccacca cgacgccagc gccgcgacca 840

ccaacaccgg cgcccaccat cgcgtcgcag cccctgtccc tgcgcccaga ggcgtgccgg 900

ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg gggctggact tcgcctgtga tatcttttgg 960

gtgctggtgg tggttggtgg agtcctggct tgctatagct tgctagtaac agtggccttt 1020

attattttct gggtgaggag agtgaagttc agcaggagcg cagacgcccc cgcgtaccag 1080

```
cagggccaga accagctcta taacgagctc aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt     1140
ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag atgggggggaa agccgagaag gaagaaccct     1200
caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagtgagatt     1260
gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca gggtctcagt     1320
acagccacca aggacaccta cgacgccctt cacatgcagg ccctgcctcc tcgcagagcc     1380
gagggcaggg gaagtcttct aacatgcggg gacgtggagg aaaatcccgg gcccatggcc     1440
gtgcccactc aggtcctggg gttgttgcta ctgtggctta cagatgccag atgtgacatc     1500
cagatgacac agtctccatc ttccctgtct gcatctgtcg gagatcgcgt caccatcacc     1560
tgtcgagcaa gtgaggacat ttattttaat ttagtgtggt atcagcagaa accaggaaag     1620
gcccctaagc tcctgatcta tgatacaaat cgcttggcag atggggtccc atcacggttc     1680
agtggctctg gatctggcac acagtatact ctaaccataa gtagcctgca acccgaagat     1740
ttcgcaacct attattgtca acactataag aattatccgc tcacgttcgg tcaggggacc     1800
aagctggaaa tcaaaagatc tggtggcgga gggtcaggag gcggaggcag cggaggcggt     1860
ggctcgggag gcggaggctc gagatctgag gtgcagttgg tggagtctgg gggcggcttg     1920
gtgcagcctg gagggtccct gaggctctcc tgtgcagcct caggattcac tctcagtaat     1980
tatggcatgc actggatcag gcaggctcca gggaagggtc tggagtgggt ctcgtctatt     2040
agtcttaatg gtggtagcac ttactatcga gactccgtga agggccgatt cactatctcc     2100
agggacaatg caaaaagcac cctctacctt caaatgaata gtctgagggc cgaggacacg     2160
gccgtctatt actgtgcagc acaggacgct tatacgggag gttactttga ttactggggc     2220
caaggaacgc tggtcacagt ctcgtctatg gatcccgccg agcccaaatc tcctgacaaa     2280
actcacacat gcccaccgtg cccagcacct cccgtggccg gcccgtcagt cttcctcttc     2340
cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc gcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg     2400
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag     2460
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc     2520
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc     2580
tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc     2640
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc     2700
agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc     2760
aatgggcaac cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc     2820
ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc     2880
tcatgctccg tgatgcatga ggccctgcac aatcactata cccagaaatc tctgagtctg     2940
```

agcccaggca agaaggaccc caagttctgg gtcctggtgg tggtgggagg cgtgctggcc 3000

tgttactctc tcctggtgac cgtggccttc atcatctttt gggtgcgctc ccgggtgaag 3060

ttttctcgct ctgccgatgc cccagcctat cagcagggcc agaatcagct gtacaatgaa 3120

ctgaacctgg gcaggcggga ggagtacgac gtgctggata agcggagagg cagagacccc 3180

gagatgggcg gcaaaccacg gcgcaaaaat ccccaggagg gactctataa cgagctgcag 3240

aaggacaaaa tggccgaggc ctattccgag atcggcatga agggagagag aagacgcgga 3300

aagggccacg acggcctgta tcagggattg tccaccgcta caaaagatac atatgatgcc 3360

ctgcacatgc aggccctgcc acccagatga 3390

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión

<400> 14

Asp Ile Glu Thr Asn Pro Gly Pro
1 5

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

<220>
<223> sitio de escisión

<400> 15

Asp Val Glu Thr Asn Pro Gly Pro
1 5

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión

<400> 16

Asp Val Glu Met Asn Pro Gly Pro
1 5

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión

<400> 17

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
1 5

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

<220>
<223> sitio de escisión

<400> 18

Asp Met Glu Ser Asn Pro Gly Pro
1 5

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

<220>
<223> sitio de escisión

<400> 19

Asp Val Glu Leu Asn Pro Gly Pro
1 5

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

<220>
<223> sitio de escisión

<400> 20

Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
1 5

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

<220>
<223> sitio de escisión

<400> 21

Asp Ile Glu Leu Asn Pro Gly Pro
1 5

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

<220>
<223> sitio de escisión

<400> 22

Asp Ile Glu Gln Asn Pro Gly Pro
1 5

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

<220>
<223> sitio de escisión

<400> 23

Asp Ser Glu Phe Asn Pro Gly Pro
1 5

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

<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

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

<220>
<223> secuencia de escisión

<400> 25

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

Pro Gly Pro

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

<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

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

<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

Pro Gly Pro

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

<220>
<223> secuencia de escisión

<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

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

<220>
<223> secuencia de escisión

<400> 29

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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de escisión

<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

<210> 31
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

Pro Gly Gly

<210> 32
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia similar a 2A

<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

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

<220>
<223> secuencia similar a 2A

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

<220>
<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

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

<220>
<223> secuencia similar a 2A

<400> 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
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia similar a 2A

<400> 36

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

Pro Gly Pro

<210> 37
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia similar a 2A

<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

<210> 38
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 39
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia similar a 2A

<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

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

<220>
<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

<210> 41
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia similar a 2A

<400> 41

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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia similar a 2A

<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

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

<220>
<223> secuencia similar a 2A

<400> 43

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

Asn Pro Gly Pro
            20
```

<210> 44
<211> 57
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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
```

<210> 45
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<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
```

<210> 46
<211> 33
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de escisión

<400> 46

```
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
```

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

<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
```

<210> 48
<211> 136
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polipéptido marcador/suicida

<400> 48

```
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

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
```

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

<220>
<223> señal de retención intracelular

<220>
<221> Característica nueva
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 49

```
Asn Pro Phe Xaa
1
```

<210> 50
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> señal de retención intracelular

<400> 50

```
Lys Asp Glu Leu
1
```

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

<220>
<223> señal de retención intracelular

<220>
<221> Característica nueva
<222> (3)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 51

Lys Lys Xaa Xaa
1

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

<220>
<223> señal de retención intracelular

<220>
<221> Característica nueva
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> Característica nueva
<222> (4)..(5)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 52

Lys Xaa Lys Xaa Xaa
1 5

<210> 53
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> señal de retención intracelular

<220>
<221> Característica nueva
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 53

Asn Pro Xaa Tyr
1

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

<220>
<223> señal de retención intracelular

<220>
<221> Característica nueva
<222> (2)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> Característica nueva
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es un aminoácido con cadena lateral hidrófoba voluminosa

<400> 54

Tyr Xaa Xaa Xaa
1

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

<220>
<223> señal de retención intracelular

<220>
<221> Característica nueva
<222> (3)..(5)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 55

Asp Glu Xaa Xaa Xaa Leu Leu Ile
1 5

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

<220>
<223> señal de retención intracelular
<220>
<221> Característica nueva
<222> (2)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 56

Asp Xaa Xaa Leu Leu
1 5

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

<220>
<223> señal de retención intracelular

<400> 57

Asp Pro Phe Trp
1

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

<220>
<223> señal de retención intracelular

<220>
<221> Característica nueva
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> Característica nueva
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 58

Phe Xaa Asp Xaa Phe
1 5

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

<220>
<223> señal de retención intracelular

<220>
<221> Característica nueva
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es un aminoácido con cadena lateral hidrófoba voluminosa

<220>
<221> Característica nueva
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> Característica nueva
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es un aminoácido con cadena lateral hidrófoba voluminosa

<400> 59

Leu Xaa Xaa Xaa Asp Glu
1 5

<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> señal de retención intracelular

<400> 60

Leu Leu Asp Leu Leu
1 5

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

<220>
<223> señal de retención intracelular

<400> 61

Pro Trp Asp Leu Trp
1 5

<210> 62
<211> 20

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 62

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

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

<220>
<223> péptido de señalización derivado de CD8a humano

<400> 63

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

His Ala Ala Arg Pro
20

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

<220>
<223> scFv aCD19

<400> 64

```
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
<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
```

<210> 66
<211> 27
<212> PRT
<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
```

<210> 67
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

```
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
```

<210> 68
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 69
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido de señalización derivado de kappa de 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

Asp Ala

<210> 70
<211> 254
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> scFv aCD33

<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
            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

<220>
<223> bisagra y Fc derivados de IgG1 humana

<400> 71

```
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

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> conector

<400> 72

Lys Asp Pro Lys
1

<210> 73
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73

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

<210> 74
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 75
<211> 36
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 75

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

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> 76
<211> 4
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 76

```
Met Glu Thr Asp
1
```

<210> 77
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 77

```
Thr Leu Ile Leu Trp Val Leu Leu Leu Leu Val
1               5                   10
```

<210> 78
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 78

```
Pro Gly Ser Thr Gly
1               5
```

<210> 79
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<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
```

<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

Thr Glu Val Phe Val Thr Gly
20

<210> 81
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<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

<210> 82
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<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

<210> 83
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<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

<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

<210> 85
<211> 25

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85

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

<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

Leu Leu Phe Gln Gln Ala Arg Ala
20

<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

Ile Leu Ala

<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

<210> 89
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89

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

<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

<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

<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

<210> 93
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 93

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

<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

Gly Ala Tyr Gly
20

<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

Cys Trp Ala

<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

Pro Leu Leu Gly Val Gly
20

<210> 97
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 97

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

<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

Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly
20

<210> 99
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> motivo ITAM

<220>
<221> Característica nueva
<222> (2)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> Característica nueva
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser Leu o Ile

<400> 99

Tyr Xaa Xaa Xaa
1

<210> 100
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia objetivo del aminoácido básico furina

<220>
<221> Característica nueva
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
<220>
<221> Característica nueva
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser Arg o Lys

<400> 100

Arg Xaa Xaa Arg
1

<210> 101
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de consenso de escisión del virus de grabado del tabaco (TEV)

<400> 101

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser
1 5

<210> 102
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> motive involucrado en la actividad de escisión

<220>
<221> Característica nueva
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> Característica nueva
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 102

Asp Xaa Glu Xaa Asn Pro Gly Pro
1 5

<210> 103
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión

<220>
<221> Característica nueva
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser Ile, Val, Met o Ser

<220>
<221> Característica nueva
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser Thr, Met, Ser, Leu, Glu, Gln o Phe

<400> 103

Asp Xaa Glu Xaa Asn Pro Gly Pro
1 5

<210> 104
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> señal del terminal C, motivo de canales de potasio

<220>
<221> Característica nueva
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 104

Arg Xaa Arg Arg
1

<210> 105
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 105

Ile Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Gln Lys Thr Thr
1 5 10

<210> 106
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 106

Val Glu Ile Gly Asn Pro Thr Tyr Lys Met Tyr Glu
1 5 10

<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

<210> 108
<211> 12
<212> PRT
<213> Drosophila sp.

<400> 108

Gly Asn Phe Ala Asn Pro Val Tyr Glu Ser Met Tyr
1 5 10

<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

<210> 110
<211> 12
<212> PRT
<213> Caenorhabditis elegans

<400> 110

Leu Arg Val Asp Asn Pro Leu Tyr Asp Pro Asp Ser
1 5 10

<210> 111
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 111

Ile Ile Phe Glu Asn Pro Met Tyr Ser Ala Arg Asp
1 5 10

<210> 112
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 112

Thr Asn Phe Glu Asn Pro Ile Tyr Ala Gln Met Glu
1 5 10

<210> 113
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 113

Asp Thr Gly Glu Asn Pro Ile Tyr Lys Ser Ala Val
1 5 10

<210> 114
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 114

Thr Thr Val Val Asn Pro Lys Tyr Glu Gly Lys
1 5 10

<210> 115
<211> 12
<212> PRT
<213> Drosophila sp.

<400> 115

Trp Asp Thr Glu Asn Pro Ile Tyr Lys Gln Ala Thr
1 5 10

<210> 116
<211> 11
<212> PRT
<213> Drosophila sp.

<400> 116

Ser Thr Phe Lys Asn Pro Met Tyr Ala Gly Lys
1 5 10

<210> 117
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 117

His Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Arg Phe Leu Glu
1 5 10

<210> 118
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 118

Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu
1 5 10

<210> 119
<211> 12
<212> PRT
<213> Drosophila sp.

<400> 119

Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Tyr Phe Glu
1 5 10

<210> 120
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 120

Tyr Ala Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Leu Ser Ala Ser
1 5 10

<210> 121
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 121

Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln Pro
1 5 10

<210> 122
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 122

Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val
1 5 10

<210> 123
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 123

Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe
1 5 10

<210> 124
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 124

Arg Lys Arg Ser His Ala Gly Tyr Gln Thr Ile
1 5 10

<210> 125
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 125

Lys His His His Ala Gly Tyr Glu Gln Phe
1 5 10

<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

<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

<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

<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

<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

<210> 131
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 131

Lys Ser Ile Arg Ser Gly Tyr Glu Val Met
1 5 10

<210> 132
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 132

His Cys Gly Gly Pro Arg Pro Gly Tyr Glu Thr Leu
1 5 10

<210> 133
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 133

His Cys Arg Thr Arg Arg Ala Glu Tyr Glu Thr Leu
1 5 10

<210> 134
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 134

Arg Arg Arg Pro Ser Ala Tyr Gln Ala Leu
1 5 10

<210> 135
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 135

Arg Arg Arg Ser Tyr Gln Asn Ile Pro
1 5

<210> 136
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 136

Lys Lys His Cys Ser Tyr Gln Asp Ile Leu
1 5 10

<210> 137
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 137

Arg Arg Arg Ser Ala Tyr Gln Asp Ile Arg
1 5 10

<210> 138
<211> 11
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 138

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

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

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

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

Lys Ile Arg Gln Arg His Gln Ser Ser Ala Tyr Gln Arg Ile
1 5 10

<210> 143
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 143

His Phe Cys Leu Tyr Arg Lys Arg Pro Gly Tyr Asp Gln Leu Asn
1 5 10 15

<210> 144
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 144

Ser Leu Ser Arg Gly Ser Gly Tyr Lys Glu Ile
1 5 10

<210> 145
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 145

Arg Arg Leu Arg Lys Gly Tyr Thr Pro Leu Met Glu Thr
1 5 10

<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

<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

<210> 148
<211> 15
<212> PRT
<213> Dictyostelium sp.

<400> 148

Arg Ser Lys Ser Asn Gln Asn Gln Ser Tyr Asn Leu Ile Gln Leu
1 5 10 15

<210> 149
<211> 17
<212> PRT
<213> Dictyostelium sp.

<400> 149

Arg Lys Thr Phe Tyr Asn Asn Asn Gln Tyr Asn Gly Tyr Asn Ile Ile
1 5 10 15

Asn

<210> 150
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 150

Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 151
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 151

Met Thr Lys Glu Tyr Gln Asp Leu Gln His Leu
1 5 10

<210> 152
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 152

Ser Tyr Lys Tyr Ser Lys Val Asn Lys Glu
1 5 10

<210> 153
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 153

Pro Ala Ala Tyr Arg Gly Val Gly Asp Asp
1 5 10

<210> 154
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 154

Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr
1 5 10

<210> 155
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 155

Leu Ile Ser Tyr Lys Gly Leu Pro Pro Glu
1 5 10

<210> 156
<211> 11
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 156

Ala Ser Asp Tyr Gln Arg Leu Asn Leu Lys Leu
1 5 10

<210> 157
<211> 11
<212> PRT
<213> Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 157

Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser Phe Gln Thr
1 5 10

<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

<210> 159
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Señal de Clasificación basada en dileucina

<220>
<221> Característica nueva
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser Asp o Glu

<220>
<221> Característica nueva
<222> (2)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> Característica nueva
<222> (7)..(7)
<223> Xaa puede ser Leu o Ile

<400> 159

Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Leu Xaa
1 5

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 160

Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn
1 5

<210> 161
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 161

Asp Glu Arg Ala Pro Leu Ile Arg Thr
1 5

<210> 162
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 162

Gln Glu Lys Asp Pro Leu Leu Lys Asn
1 5

<210> 163
<211> 9
<212> PRT
<213> Coturnix sp.

<400> 163

Thr Glu Arg Asn Pro Leu Leu Lys Ser
1 5

<210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 164

Gly Glu Asn Ser Pro Leu Leu Ser Gly
1 5

<210> 165
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 165

Glu Glu Lys Gln Pro Leu Leu Met Glu
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> Oryzias latipes

<400> 166

Gly Glu Arg Gln Pro Leu Leu Gln Ser
1 5

<210> 167
<211> 9
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<400> 167

Pro Glu Ile Gln Pro Leu Leu Thr Glu
1 5

<210> 168
<211> 9
<212> PRT
<213> Carassius auratus

<400> 168

Glu Gly Arg Gln Pro Leu Leu Gly Asp
1 5

<210> 169
<211> 9

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 169

Glu Ala Asn Gln Pro Leu Leu Thr Asp
1 5

<210> 170
<211> 9
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<400> 170

Glu Leu His Gln Pro Leu Leu Thr Asp
1 5

<210> 171
<211> 9
<212> PRT
<213> Danio rerio

<400> 171

Arg Glu Phe Glu Pro Leu Leu Asn Ala
1 5

<210> 172
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 172

Glu Glu Lys Met Ala Ile Leu Met Asp
1 5

<210> 173
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 173

Glu Glu Lys Leu Ala Ile Leu Ser Gln
1 5

<210> 174
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 174

Ser Glu Arg Asp Val Leu Leu Asp Glu
1 5

<210> 175
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 175

Ser Glu Arg Arg Asn Leu Leu Glu Asp
1 5

<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 176

Asp Asp Ser Gly Asp Leu Leu Pro Gly
1 5

<210> 177
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 177

Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu
1 5

<210> 178
<211> 9
<212> PRT
<213> Felis catus

<400> 178

Ser His Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu
1 5

<210> 179
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 179

Arg Arg Thr Pro Ser Leu Leu Glu Gln
1 5

<210> 180
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 180

His Arg Thr Pro Ser Leu Leu Glu Gln
1 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

<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

<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

<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

<210> 185
<211> 23
<212> PRT
<213> Danio rerio

<400> 185

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

<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

Val Asn Met Gly Pro Gln Pro
20

<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

Glu Gly Leu Ile Asp Pro Gln Asn
20

<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

<210> 189
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 189

Thr Glu Arg Glu Arg Leu Leu Asn Phe
1 5

<210> 190
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 190

Val Glu Thr Asp Asp Leu Ile Leu
1 5

<210> 191
<211> 7
<212> PRT
<213> Caenorhabditis elegans

<400> 191

Phe Glu Asn Asp Ser Leu Leu
1 5

<210> 192
<211> 9
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 192

Asn Glu Gln Ser Pro Leu Leu His Asn
1 5

<210> 193
<211> 8
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 193

Ser Glu Gln Thr Arg Leu Val Pro
1 5

<210> 194
<211> 8
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 194

Glu Val Asp Leu Asp Leu Leu Lys
1 5

<210> 195
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 195

Ser Phe His Asp Asp Ser Asp Glu Asp Leu Leu His Ile
1 5 10

<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

<210> 197
<211> 13
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 197

Ser Phe His Asp Asp Ser Asp Glu Asp Leu Leu Asn Ile
1 5 10

<210> 198
<211> 13
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<400> 198

Ser Phe His Asp Asp Ser Asp Glu Asp Leu Leu Asn Val
1 5 10

<210> 199
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 199

Glu Glu Ser Glu Glu Arg Asp Asp His Leu Leu Pro Met
1 5 10

<210> 200
<211> 13
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<400> 200

Asp Glu Ser Glu Glu Arg Asp Asp His Leu Leu Pro Met
1 5 10

<210> 201
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<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

<400> 202

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.

<400> 203

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

<400> 204

Met Leu Glu Ala Ser Asp Asp Glu Ala Leu Leu Val Cys
1 5 10

<210> 205
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 205

Lys Asn Glu Thr Ser Asp Asp Glu Ala Leu Leu Leu Cys
1 5 10

<210> 206
<211> 12

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 206

Trp Val Val Glu Ala Glu Asp Glu Pro Leu Leu Ala
1 5 10

<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

<210> 208
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 208

His Asp Asp Phe Ala Asp Asp Ile Ser Leu Leu Lys
1 5 10

<210> 209
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 209

Gly Arg Asp Ser Pro Glu Asp His Ser Leu Leu Val Asn
1 5 10

<210> 210
<211> 12
<212> PRT
<213> Peromyscus maniculatus

<400> 210

Val Arg Cys His Pro Glu Asp Asp Arg Leu Leu Gly
1 5 10

<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

<210> 212
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 212

Ala Ser Val Ser Leu Leu Asp Asp Glu Leu Met Ser Leu
1 5 10

<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

<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

<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

<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

<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

<210> 218
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 218

Arg Asp Arg Asp Tyr Asp Glu Asp Asp Glu Asp Asp Ile
1 5 10

<210> 219
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 219

Leu Asp Glu Thr Glu Asp Asp Glu Leu Glu Tyr Asp Asp Glu Ser
1 5 10 15

<210> 220
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 220

Lys Asp Pro Asp Glu Val Glu Thr Glu Ser
1 5 10

<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

<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

<210> 223
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 223

Gly Glu Asp Glu Glu Ser Glu Ser Asp
1 5

<210> 224
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 224

Gly Glu Asp Ser Asp Glu Glu Pro Asp His Glu Glu
1 5 10

<210> 225
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 225

Leu Glu Asp Asp Ser Asp Glu Glu Glu Asp Phe
1 5 10

<210> 226
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 226

Lys Asp Ser Asp Glu Glu Glu Asn Val
1 5

<210> 227
<211> 13
<212> PRT
<213> Herpesvirus 3

<400> 227

Phe Glu Asp Ser Glu Ser Thr Asp Thr Glu Glu Glu Phe
1 5 10

<210> 228
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 228

Leu Glu Ala Gln Glu Glu Glu Glu Val
1 5

<210> 229
<211> 22
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 229

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

<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

<210> 231
<211> 18
<212> PRT
<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

<210> 232
<211> 15
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 232

Phe Glu Ile Glu Glu Asp Asp Val Pro Thr Leu Glu Glu Glu His
1 5 10 15

<210> 233
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> señal de retención intracelular

<400> 233

His Asp Glu Leu
1

REIVINDICACIONES

1. Un constructo de ácido nucleico que comprende la siguiente estructura:

A-X-B

en la cual

A y B son secuencias de ácido nucleico que codifican un primer receptor de antígeno quimérico (CAR) y un segundo CAR; y
X es una secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio de escisión,
en el que
el primer CAR y el segundo CAR reconocen diferentes antígenos;
el primer CAR y el segundo CAR comprenden cada uno un endodominio activador; y en el que

(a) el primer CAR y/o el segundo CAR comprenden una señal de retención intracelular seleccionada del siguiente grupo: una señal de endocitosis; una señal de retención de Golgi; una señal de reciclaje de la red trans-Golgi (TGN); una señal de retención del retículo endoplásmico (ER); y una señal de clasificación lisosómica; y/o
(b) el péptido de señalización del primer o segundo CAR comprende una o más mutaciones de tal manera que el péptido de señalización del primer CAR y el segundo CAR difieren en su número de aminoácidos hidrófobos y en el que un péptido de señalización comprende hasta cinco aminoácidos hidrófobos más que el otro péptido de señalización.

2. Un constructo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer CAR y/o el segundo CAR comprende una señal de retención intracelular que dirige el CAR a un compartimento intracelular unido a la membrana.

3. Un constructo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el primer CAR y/o el segundo CAR comprenden una señal de retención intracelular que dirige el CAR a un compartimento lisosómico, endosómico o de Golgi.

4. Un constructo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido de señalización del primer CAR o segundo CAR comprende una o más mutaciones de tal manera que tiene menos aminoácidos hidrófobos que a) su secuencia de tipo silvestre o b) el péptido de señalización del otro CAR.

5. Un constructo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el o los aminoácidos hidrófobos eliminados o reemplazados por mutación se seleccionan del grupo: Alanina (A); Valina (V); Isoleucina (I); Leucina (L); Metionina (M); Fenilalanina (P); Tirosina (Y); Triptófano (W).

6. Un constructo de ácido nucleico de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que comprende la siguiente estructura:

A-X-B-Y-C

en la cual

A, B y C son secuencias de ácido nucleico que codifican un primero, segundo y tercer polipéptidos de interés (POI); y X e Y son secuencias de ácido nucleico que pueden ser iguales o diferentes, cada una de las cuales codifica un sitio de escisión, en el que al menos dos de los POI son receptores de antígeno quimérico (CAR) que

(a) comprenden una señal de retención intracelular; y/o
(b) difieren en el número de aminoácidos hidrófobos en sus péptidos señal.

7. Un constructo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, que codifica dos CAR que comprenden una señal de retención intracelular, en la que los dos CAR:

(a) comprenden diferentes señales de retención intracelular; y/o
(b) tienen la señal de retención intracelular ubicada en una posición diferente en el CAR, de modo que cuando el ácido nucleico se expresa en una célula, existe una expresión relativa diferencial de los dos CAR en la superficie celular.

8. Un constructo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que el tercer POI es un polipéptido que permite la selección de células transducidas y/o permite que se eliminen las células que expresan el polipéptido.

9. Un vector que comprende un constructo de ácido nucleico de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.

10. Una célula que comprende un constructo de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un vector de acuerdo con la reivindicación 9.

11. Un método para elaborar una célula de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende la etapa de introducir un constructo de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un vector de acuerdo con la reivindicación 9 en una célula *ex vivo*.

12. Una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de células de acuerdo con la reivindicación 10.

13. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12 para usar en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

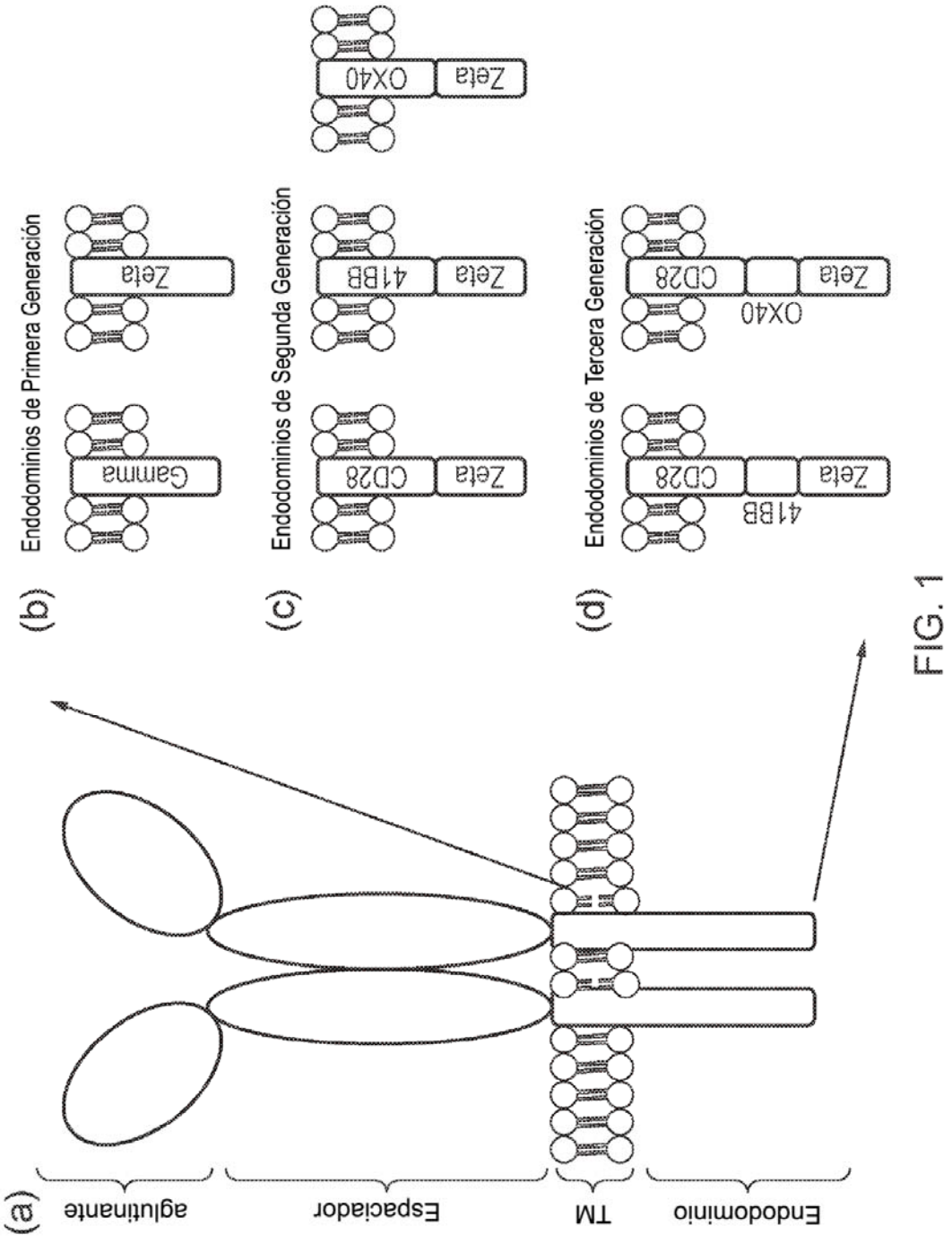
(a)
aglutinante
Espaciador
TM
Endodominio
(b)
Endodominios de Primera Generación
Zeta
Gamma
(c)
Endodominios de Segunda Generación
Zeta
41BB
Zeta
CD28
Zeta
OX40
(d)
Endodominios de Tercera Generación
Zeta
CD28
41BB
Zeta
CD28
OX40

FIG. 1

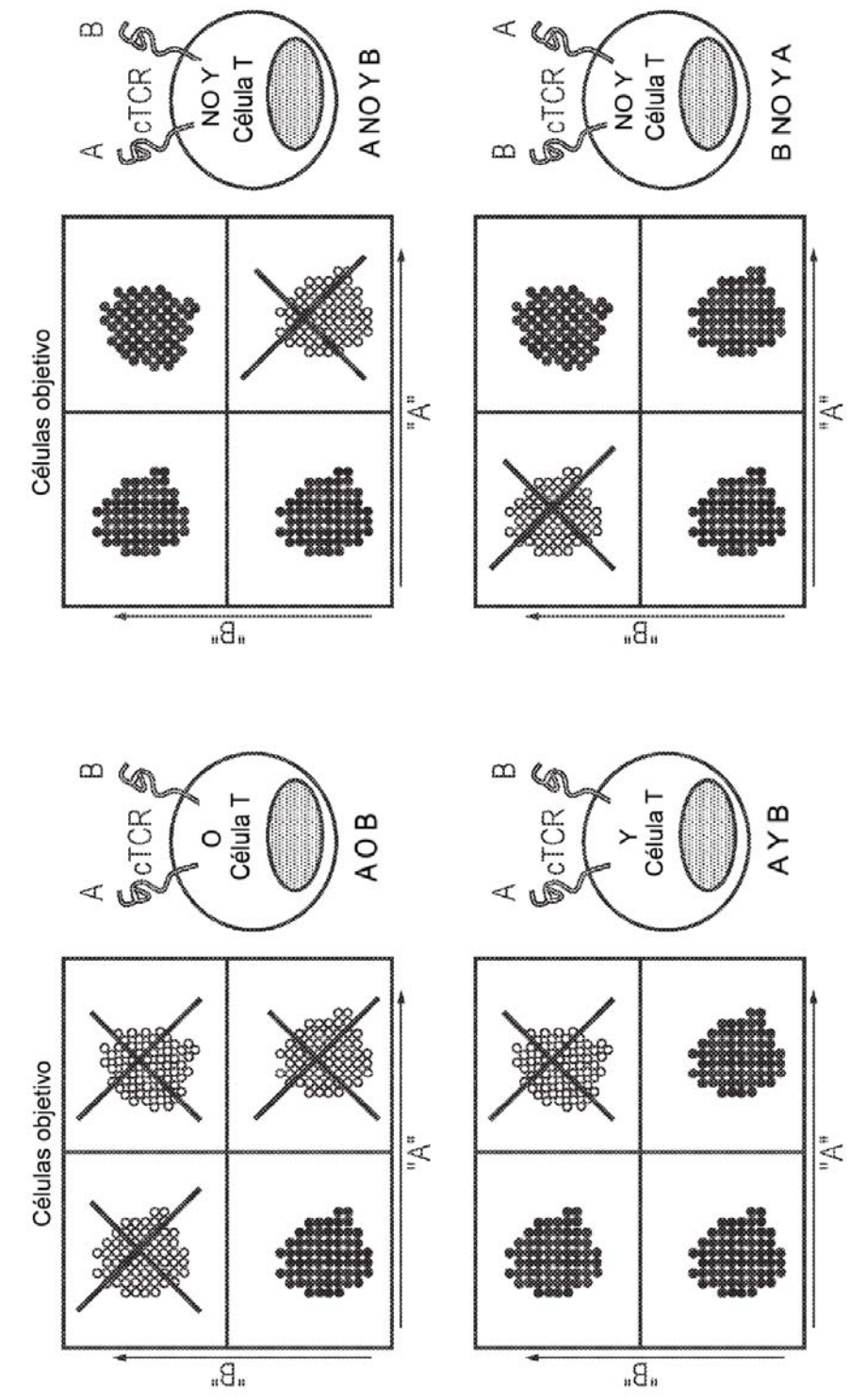
Células objetivo
"B"
"A"
A
B
cTCR
Célula T
A O B
A Y B
A NO Y B
B NO Y A
O
Y
NO Y

FIG. 2

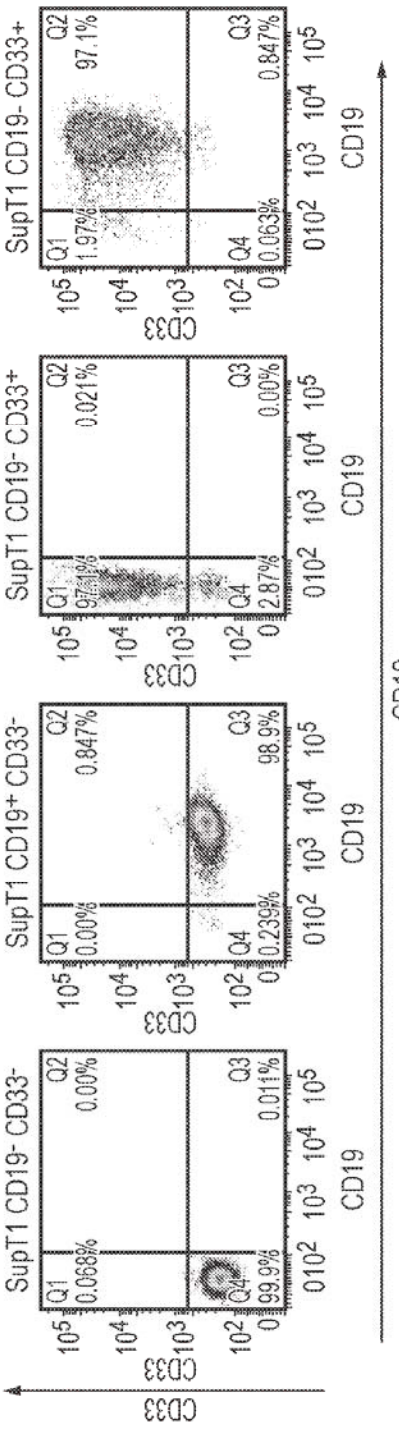
SupT1 CD19- CD33-
SupT1 CD19+ CD33-
SupT1 CD19- CD33+
SupT1 CD19- CD33+
CD33
CD19
Q1
Q2
Q3
Q4
0.068%
0.00%
99.9%
0.011%
0.00%
0.847%
0.239%
98.9%
0.021%
97.9%
2.87%
0.00%
1.97%
97.1%
0.063%
0.847%

FIG. 3

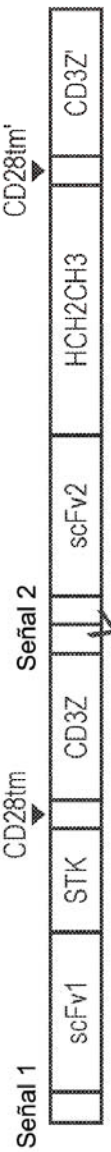
Señal 1
scFv1
STK
CD28tm
Señal 2
CD3Z
2A
scFv2
HCH2CH3
CD28tm'
CD3Z'

FIG. 4

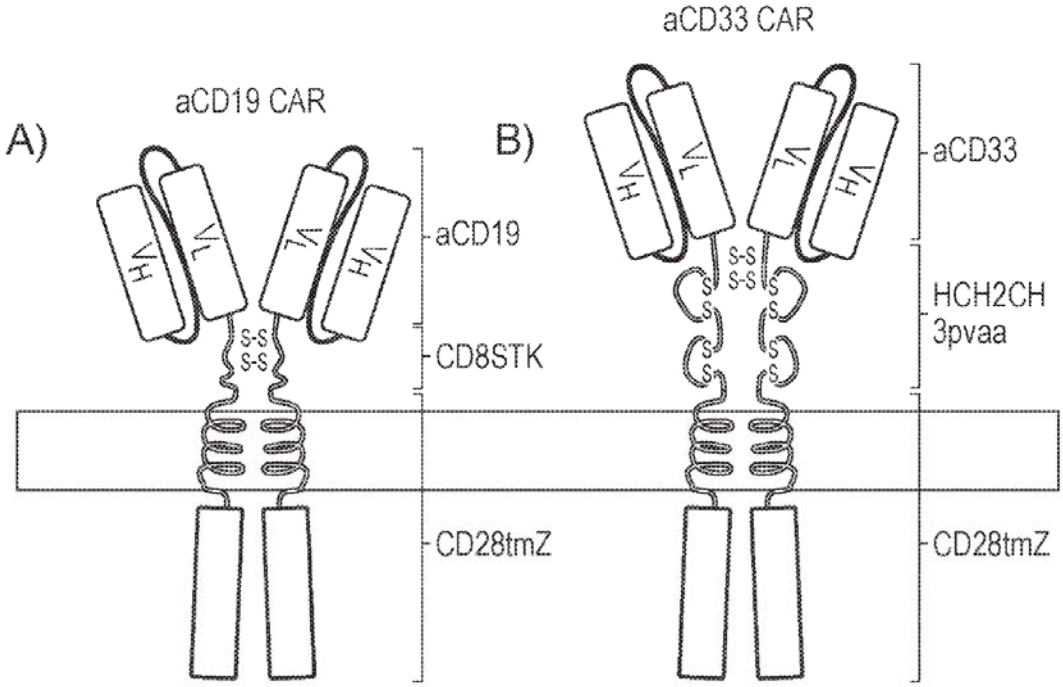
A)
aCD19 CAR
VH
VL
VL
VH
S-S
S-S
aCD19
CD8STK
CD28tmZ
B)
aCD33 CAR
VH
VL
VL
VH
S-S
S-S
aCD33
HCH2CH
3pvaa
CD28tmZ

FIG. 5

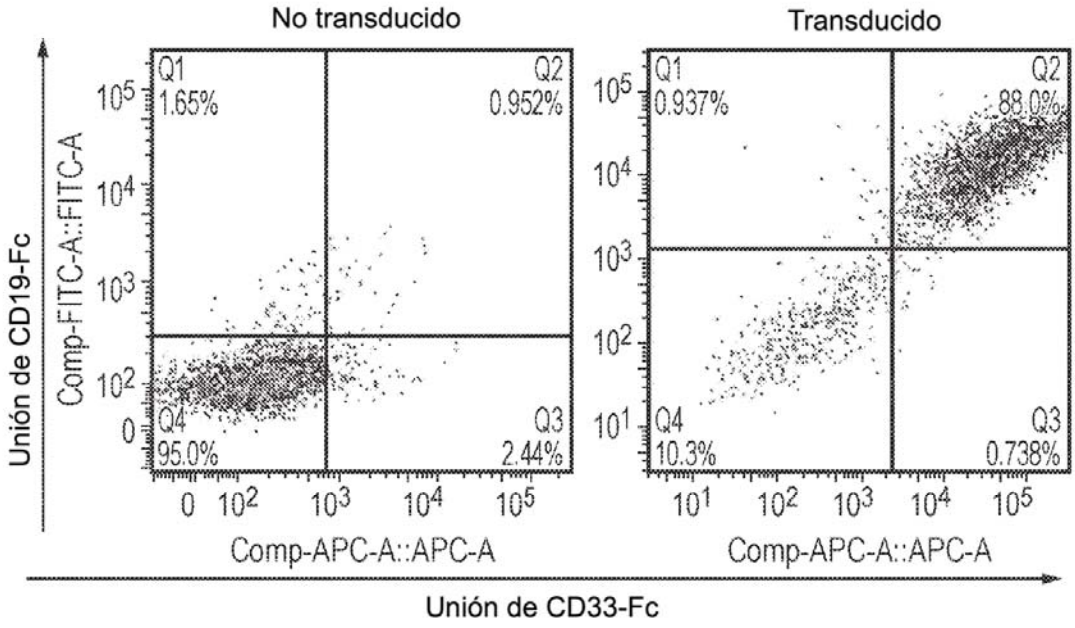
No transducido
Transducido
Q1
1.65%
Q2
0.952%
Q4
95.0%
Q3
2.44%
Q1
0.937%
Q2
88.0%
Q4
10.3%
Q3
0.738%
Comp-FITC-A::FITC-A
Unión de CD19-Fc
Comp-APC-A::APC-A
Comp-APC-A::APC-A
Unión de CD33-Fc

FIG. 6

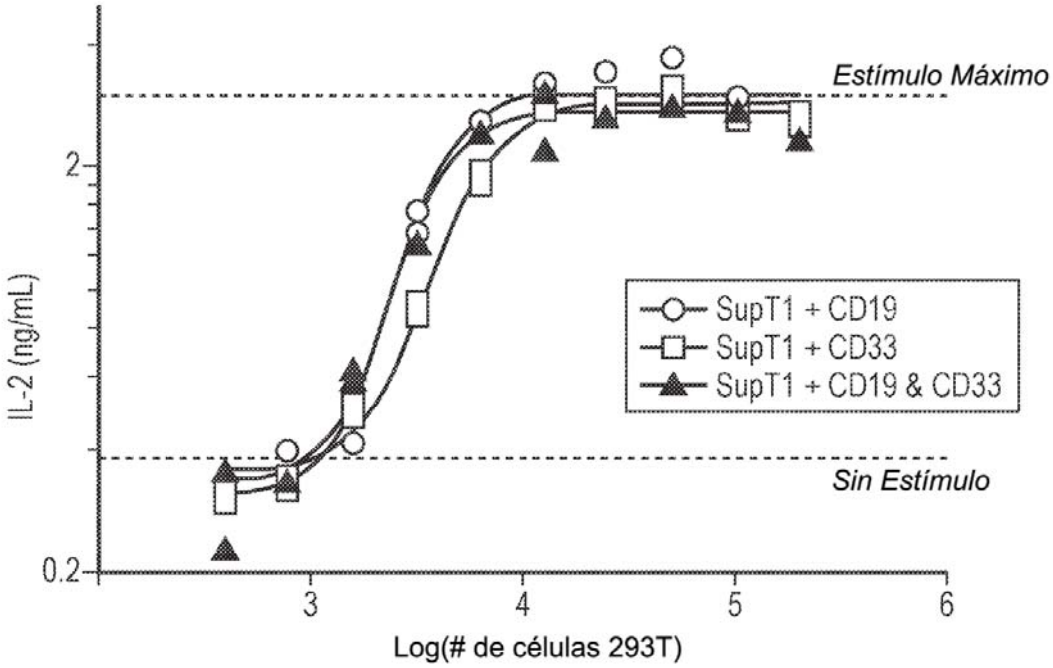
Estímulo Máximo
Sin Estímulo
SupT1 + CD19
SupT1 + CD33
SupT1 + CD19 & CD33
IL-2 (ng/mL)
2
0.2
3
4
5
6
Log(# de células 293T)

FIG. 7

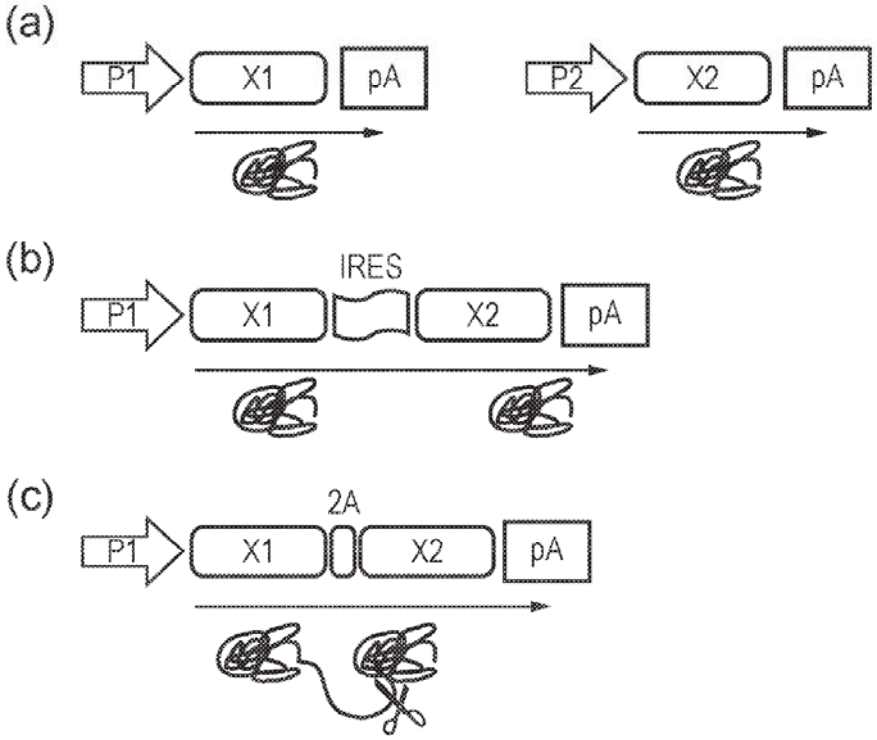
(a)
P1
X1
pA
P2
X2
pA
(b)
IRES
P1
X1
X2
pA
(c)
2A
P1
X1
X2
pA

FIG. 8

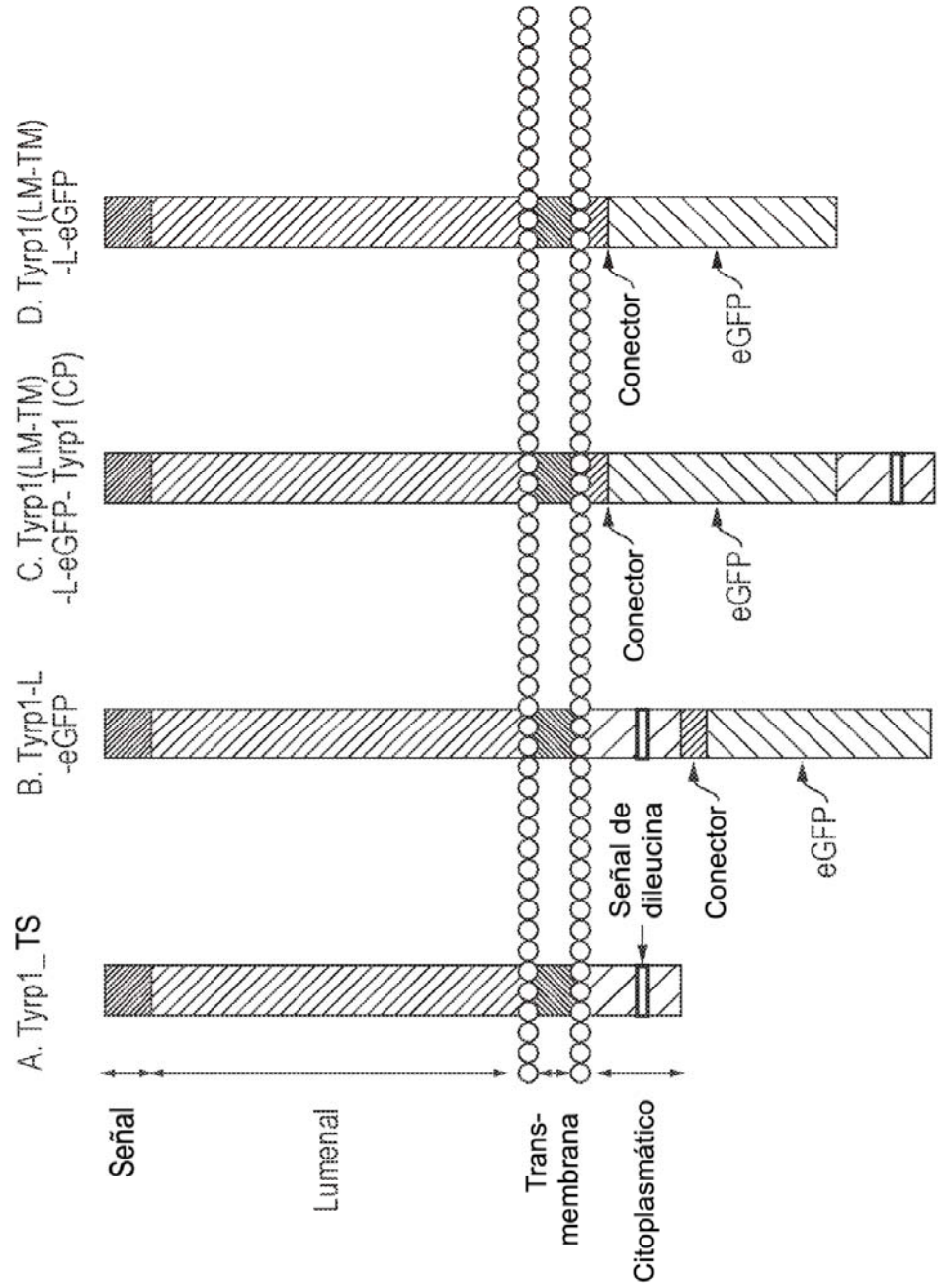
A. Tyrp1_TS
B. Tyrp1-L -eGFP
C. Tyrp1(LM-TM) -L-eGFP- Tyrp1 (CP)
D. Tyrp1(LM-TM) -L-eGFP
Señal
Lumenal
Trans-membrana
Citoplasmático
Señal de dileucina
Conector
eGFP
Conector
eGFP
Conector
eGFP

FIG. 9

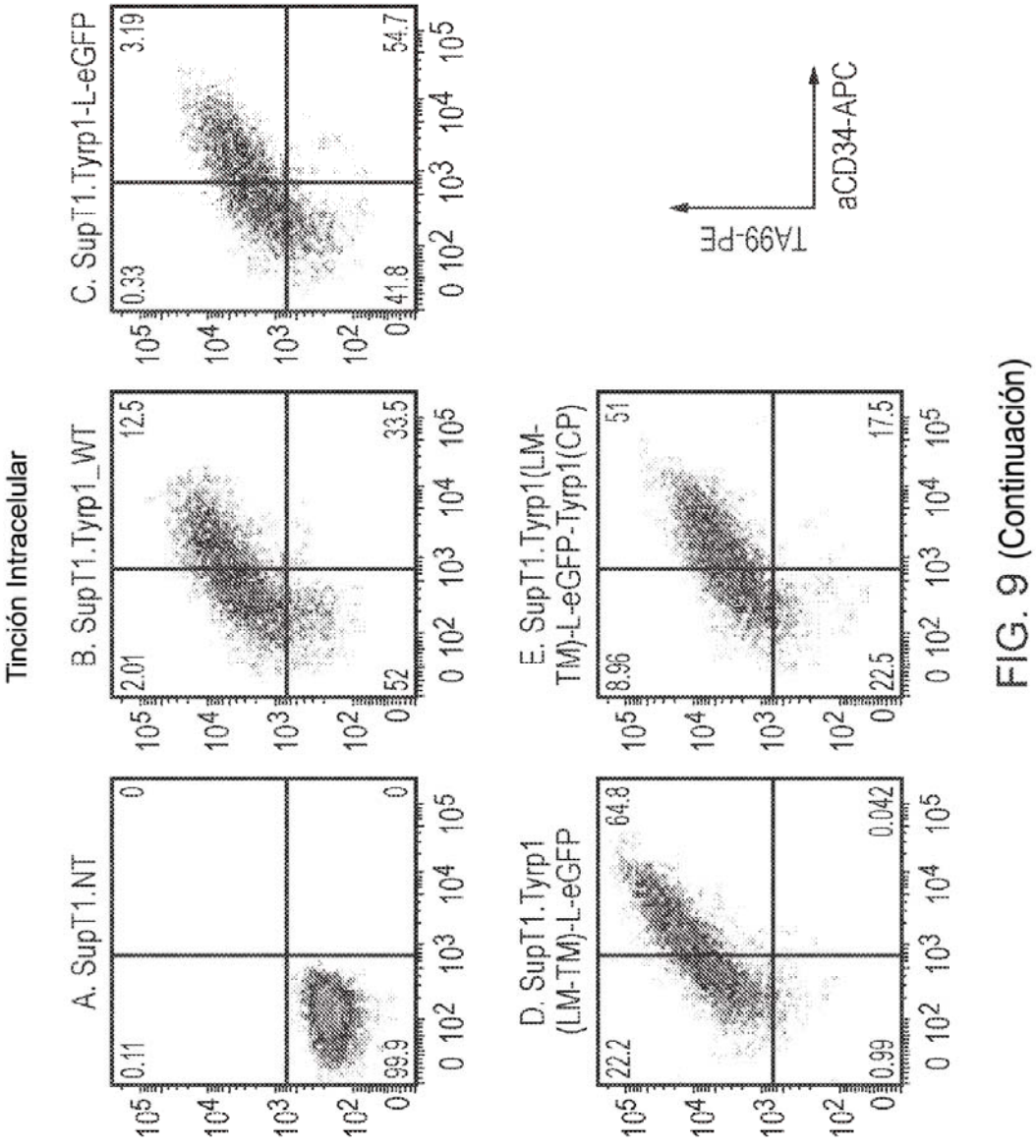

FIG. 9 (Continuación)

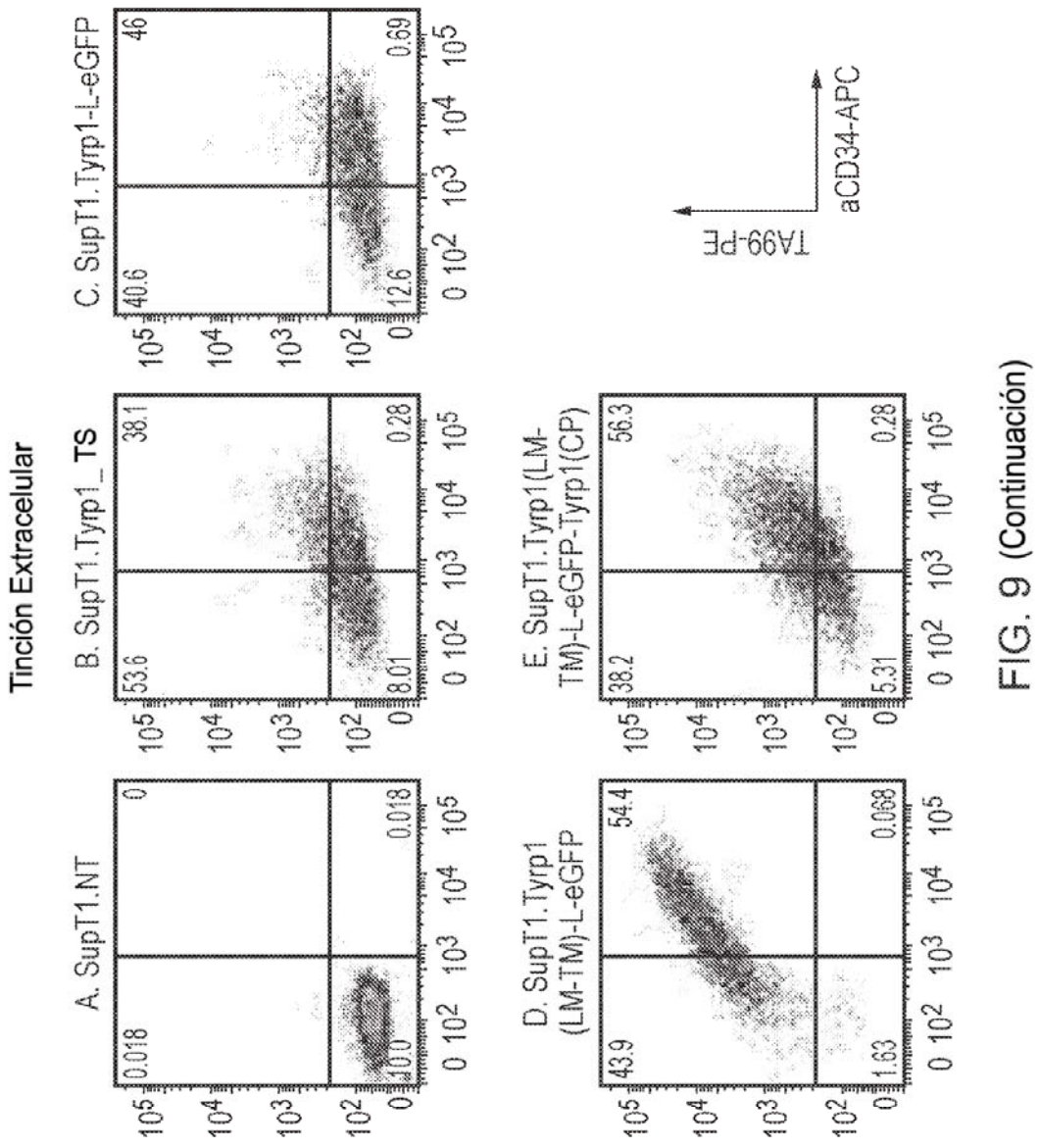

FIG. 9 (Continuación)

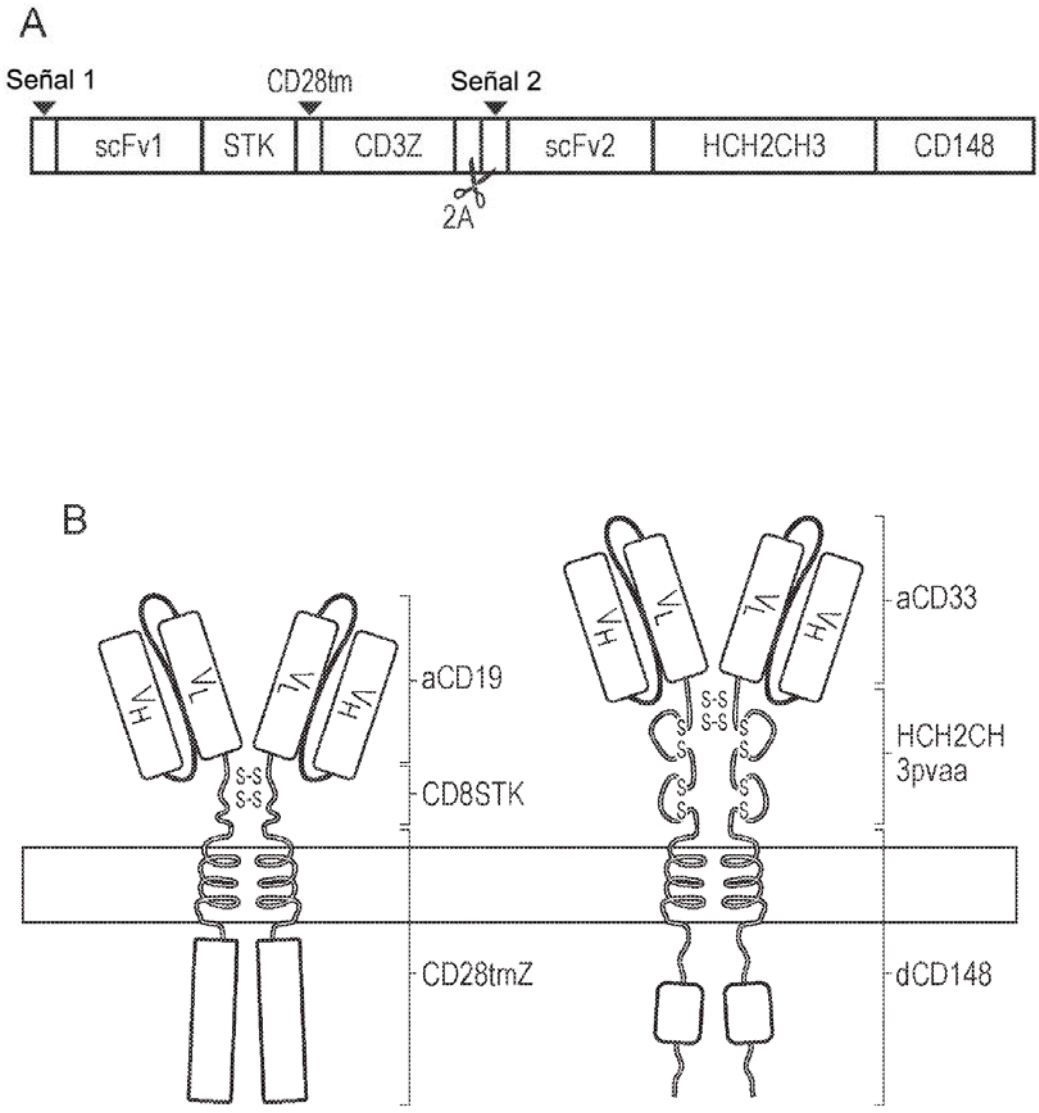
A
Señal 1
CD28tm
Señal 2
scFv1
STK
CD3Z
scFv2
HCH2CH3
CD148
2A
B
aCD19
CD8STK
CD28tmZ
aCD33
HCH2CH
3pvaa
dCD148
S-S
S-S

FIG. 10

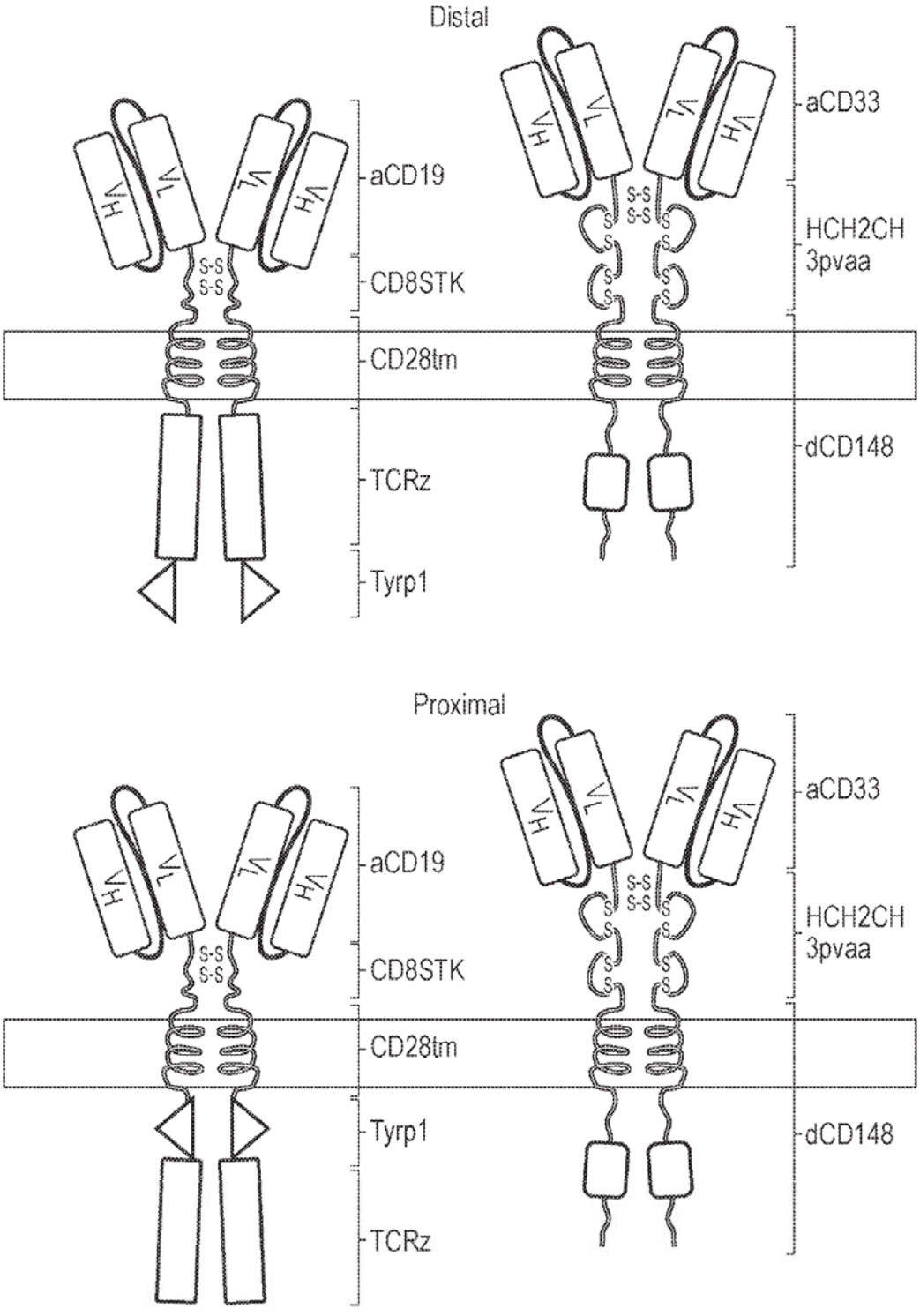

FIG. 10 (Continuación)

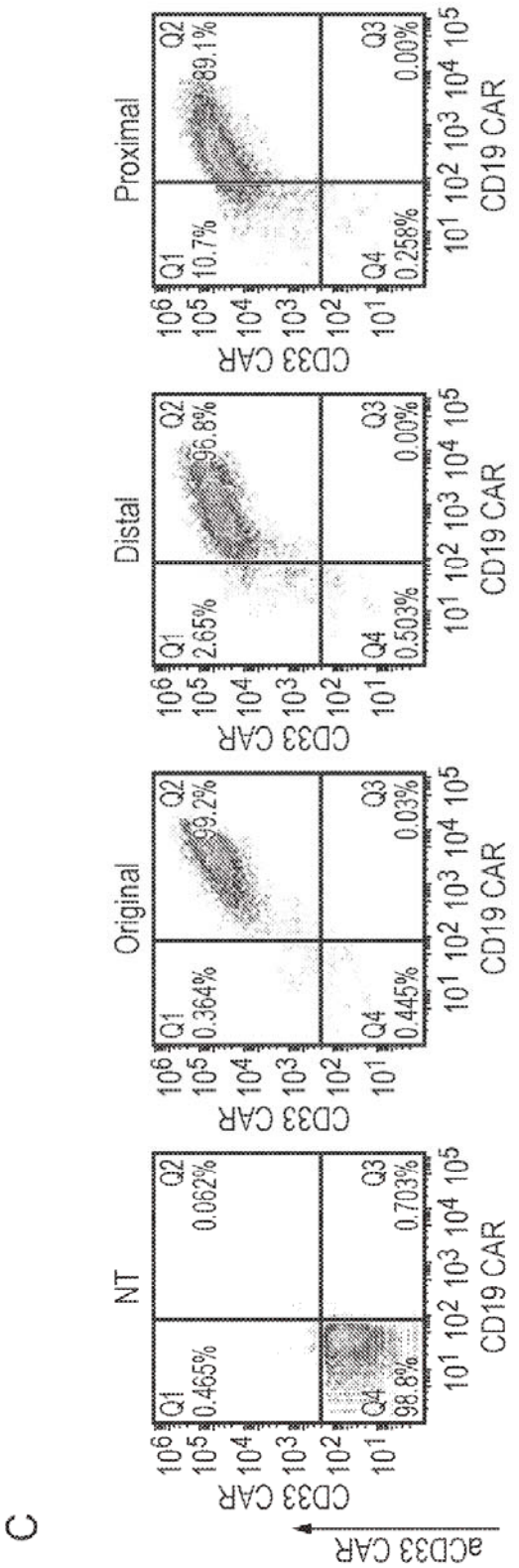

FIG. 10 (Continuación)

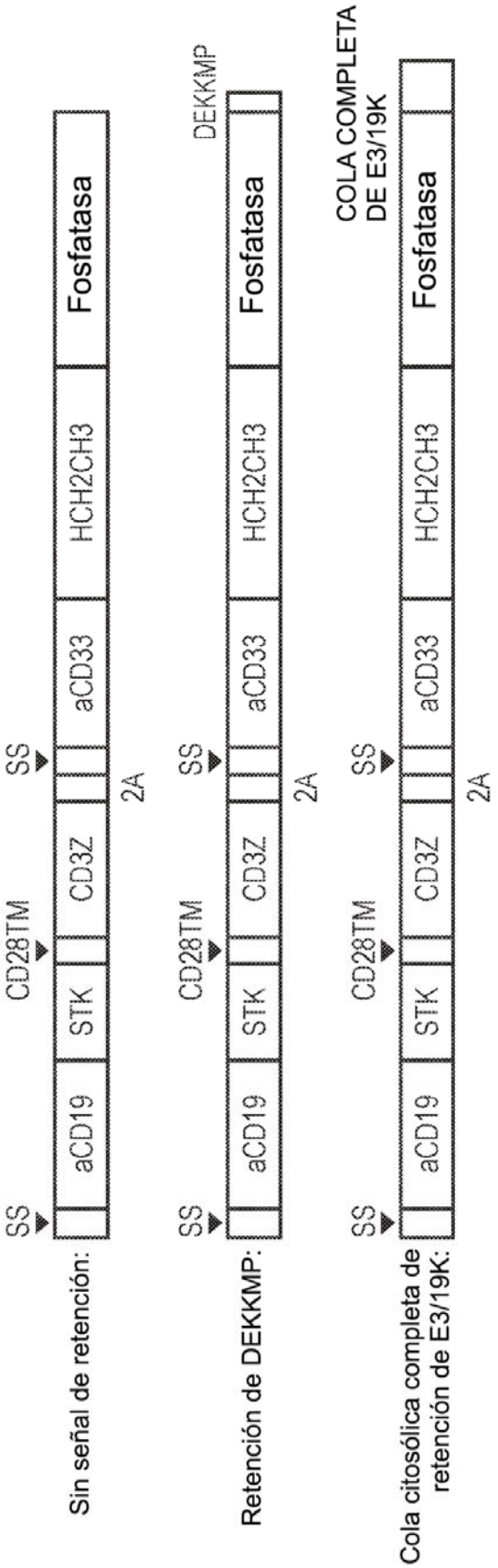
Sin señal de retención:
SS
aCD19
CD28TM
STK
CD3Z
2A
SS
aCD33
HCH2CH3
Fosfatasa
Retención de DEKKMP:
DEKKMP
COLA COMPLETA DE E3/19K
Cola citosólica completa de retención de E3/19K:

FIG. 11

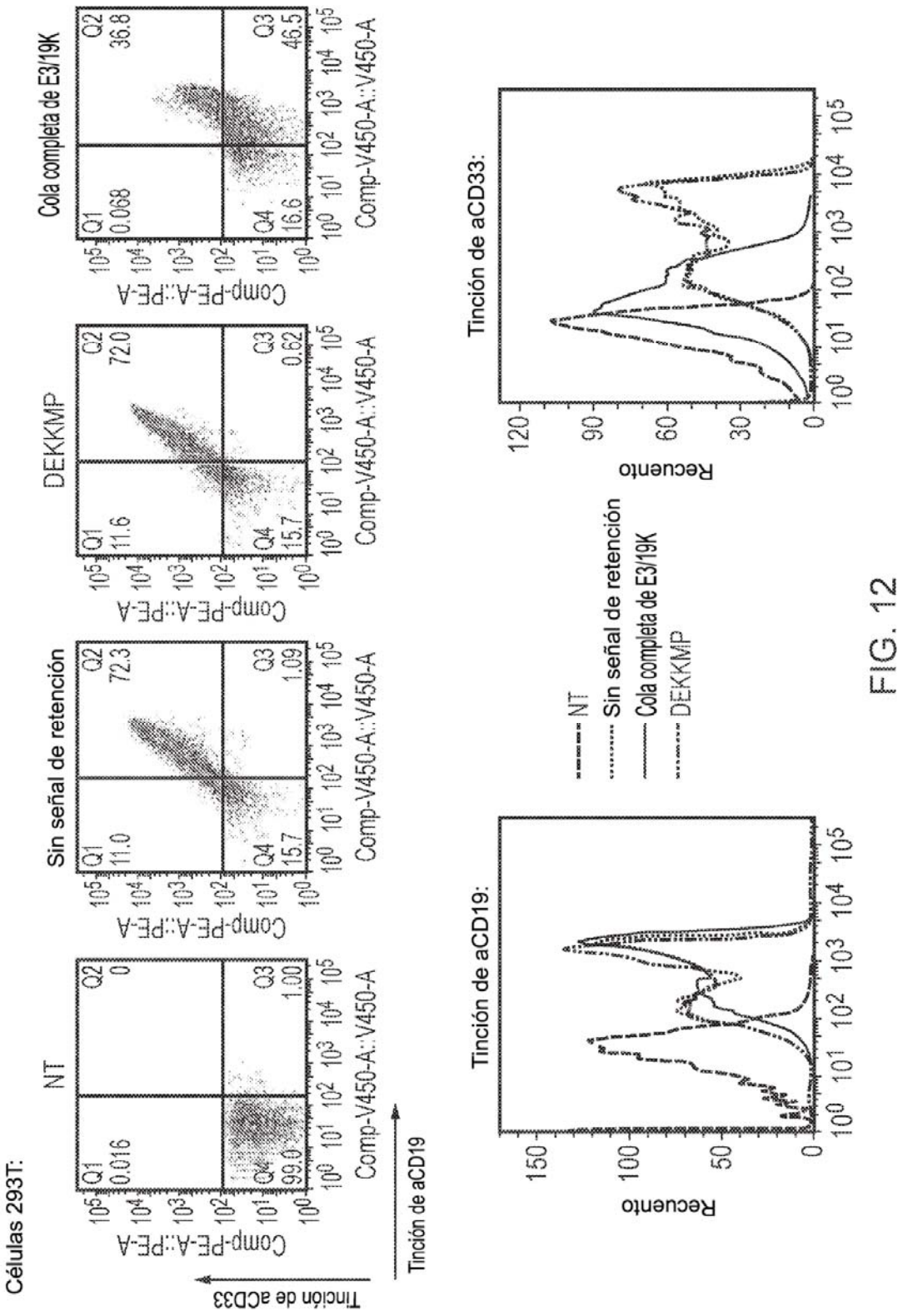
Células 293T:
NT
Sin señal de retención
DEKKMP
Cola completa de E3/19K
Tinción de aCD33
Tinción de aCD19
Comp-PE-A::PE-A
Comp-V450-A::V450-A
Q1 0.016
Q2 0
Q4 99.0
Q3 1.00
Q1 11.0
Q2 72.3
Q4 15.7
Q3 1.09
Q1 11.6
Q2 72.0
Q4 15.7
Q3 0.62
Q1 0.068
Q2 36.8
Q4 16.6
Q3 46.5
Tinción de aCD19:
Tinción de aCD33:
Recuento
NT
Sin señal de retención
Cola completa de E3/19K
DEKKMP

FIG. 12

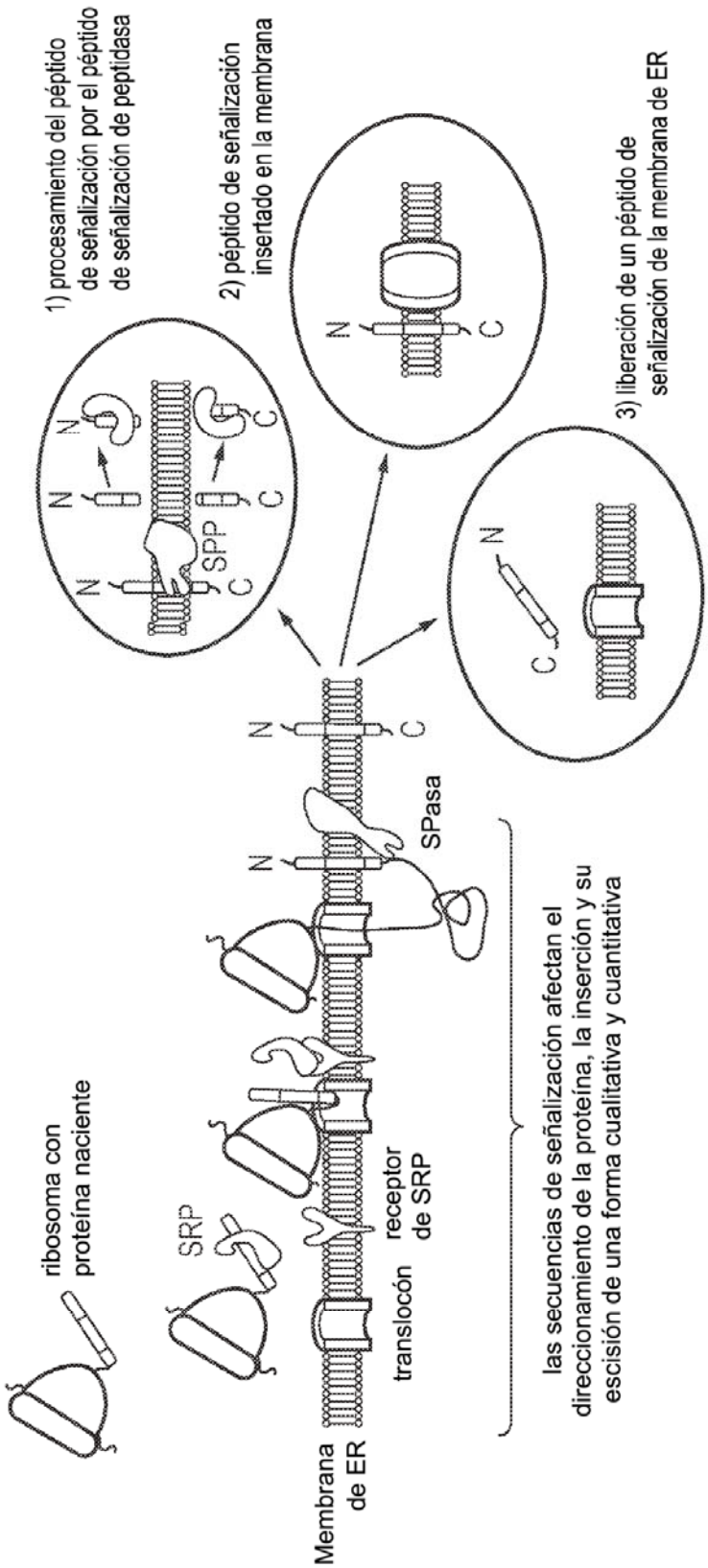
ribosoma con proteína naciente
SRP
receptor de SRP
translocón
Membrana de ER
SPasa
las secuencias de señalización afectan el direccionamiento de la proteína, la inserción y su escisión de una forma cualitativa y cuantitativa
1) procesamiento del péptido de señalización por el péptido de señalización de peptidasa
2) péptido de señalización insertado en la membrana
3) liberación de un péptido de señalización de la membrana de ER
N
C
SPP

FIG. 13

Mutantes
SS
CD28TM
SS
Péptido de señalización de TS:
aCD19
ST
CD3Z
aCD33
HCH2CH3
Fosfatasa
2A

FIG. 14

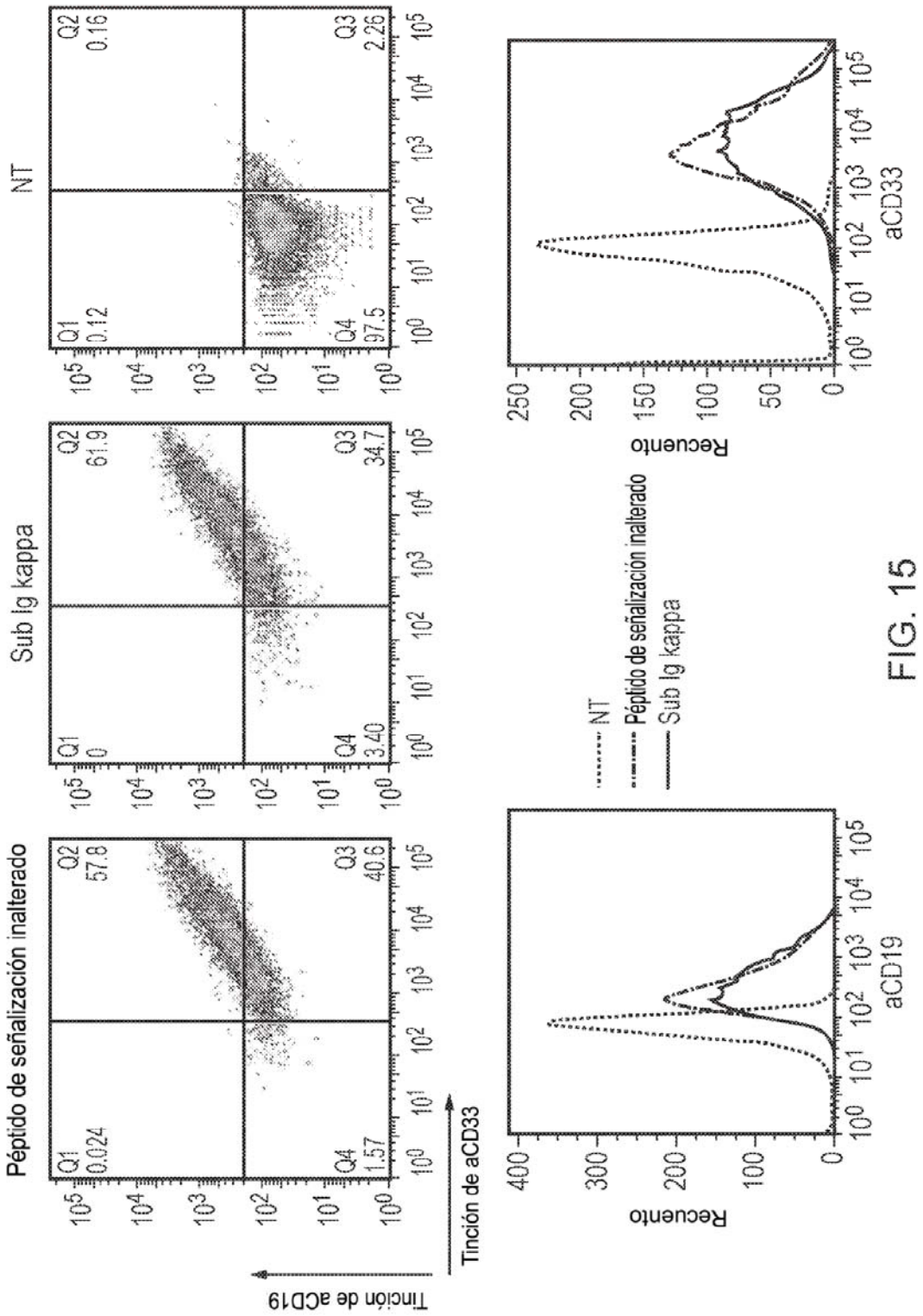
Péptido de señalización inalterado
Sub Ig kappa
NT
Tinción de aCD19
Tinción de aCD33
Q1 0.024
Q2 57.8
Q3 40.6
Q4 1.57
Q1 0
Q2 61.9
Q3 34.7
Q4 3.40
Q1 0.12
Q2 0.16
Q3 2.26
Q4 97.5
Recuento
aCD19
aCD33
NT
Péptido de señalización inalterado
Sub Ig kappa

FIG. 15

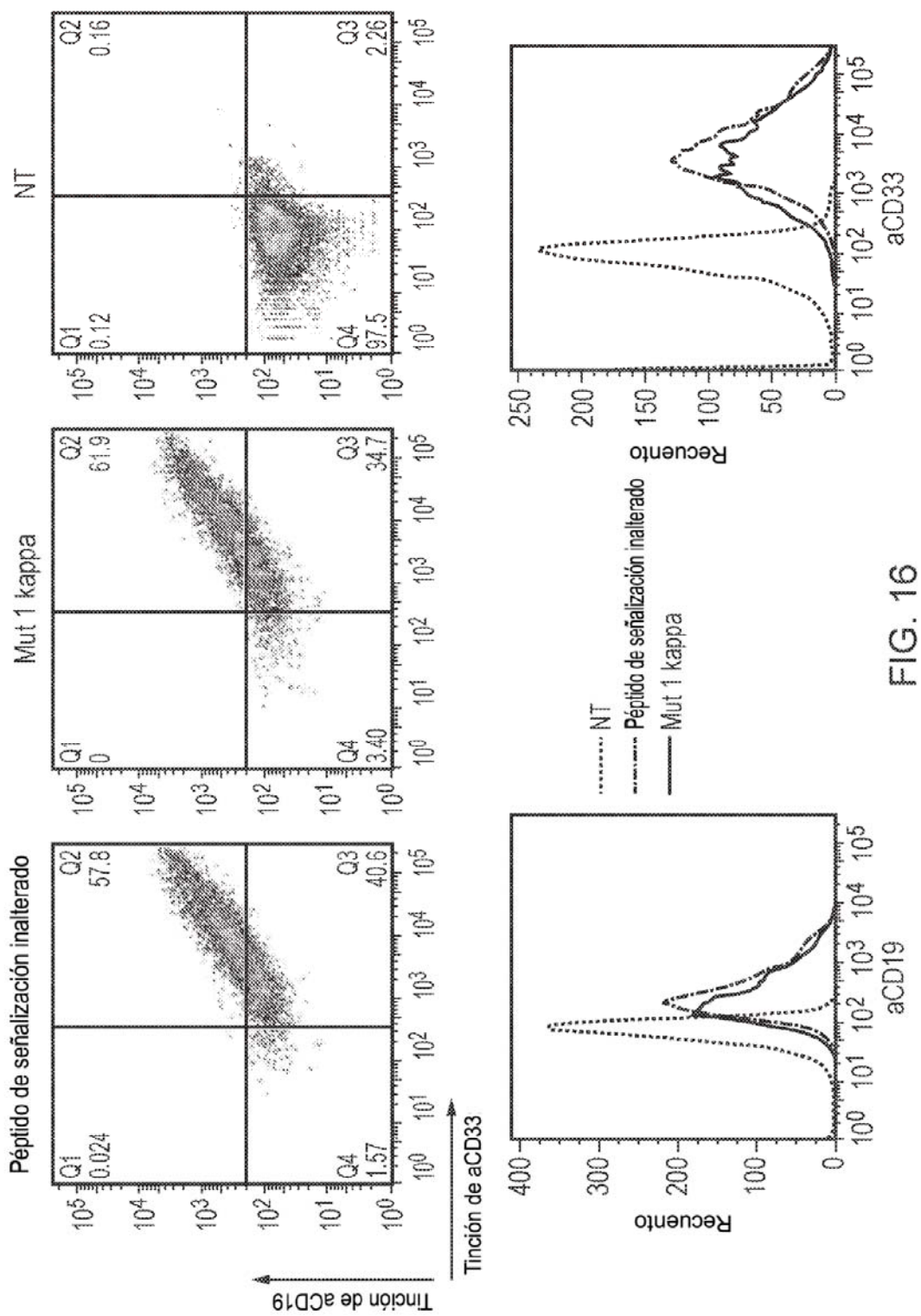
Péptido de señalización inalterado
Mut 1 kappa
NT
Tinción de aCD19
Tinción de aCD33
Q1 0.024
Q2 57.8
Q4 1.57
Q3 40.6
Q1 0
Q2 61.9
Q4 3.40
Q3 34.7
Q1 0.12
Q2 0.16
Q4 97.5
Q3 2.26
Recuento
aCD19
aCD33
NT
Péptido de señalización inalterado
Mut 1 kappa

FIG. 16

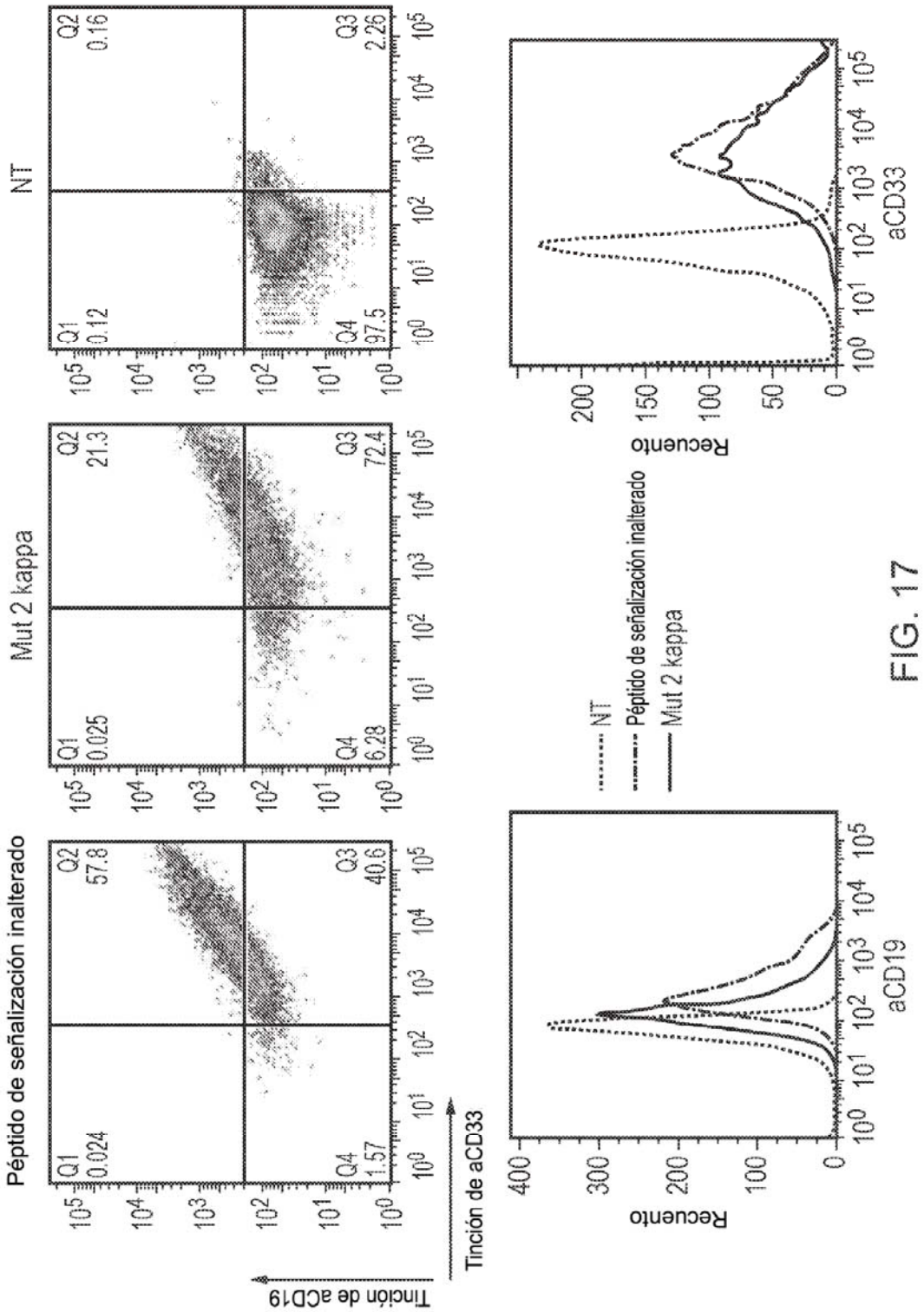
Péptido de señalización inalterado
Mut 2 kappa
NT
Q1 0.024
Q2 57.8
Q4 1.57
Q3 40.6
Q1 0.025
Q2 21.3
Q4 6.28
Q3 72.4
Q1 0.12
Q2 0.16
Q4 97.5
Q3 2.26
Tinción de aCD19
Tinción de aCD33
Recuento
aCD19
aCD33
NT
Péptido de señalización inalterado
Mut 2 kappa

FIG. 17

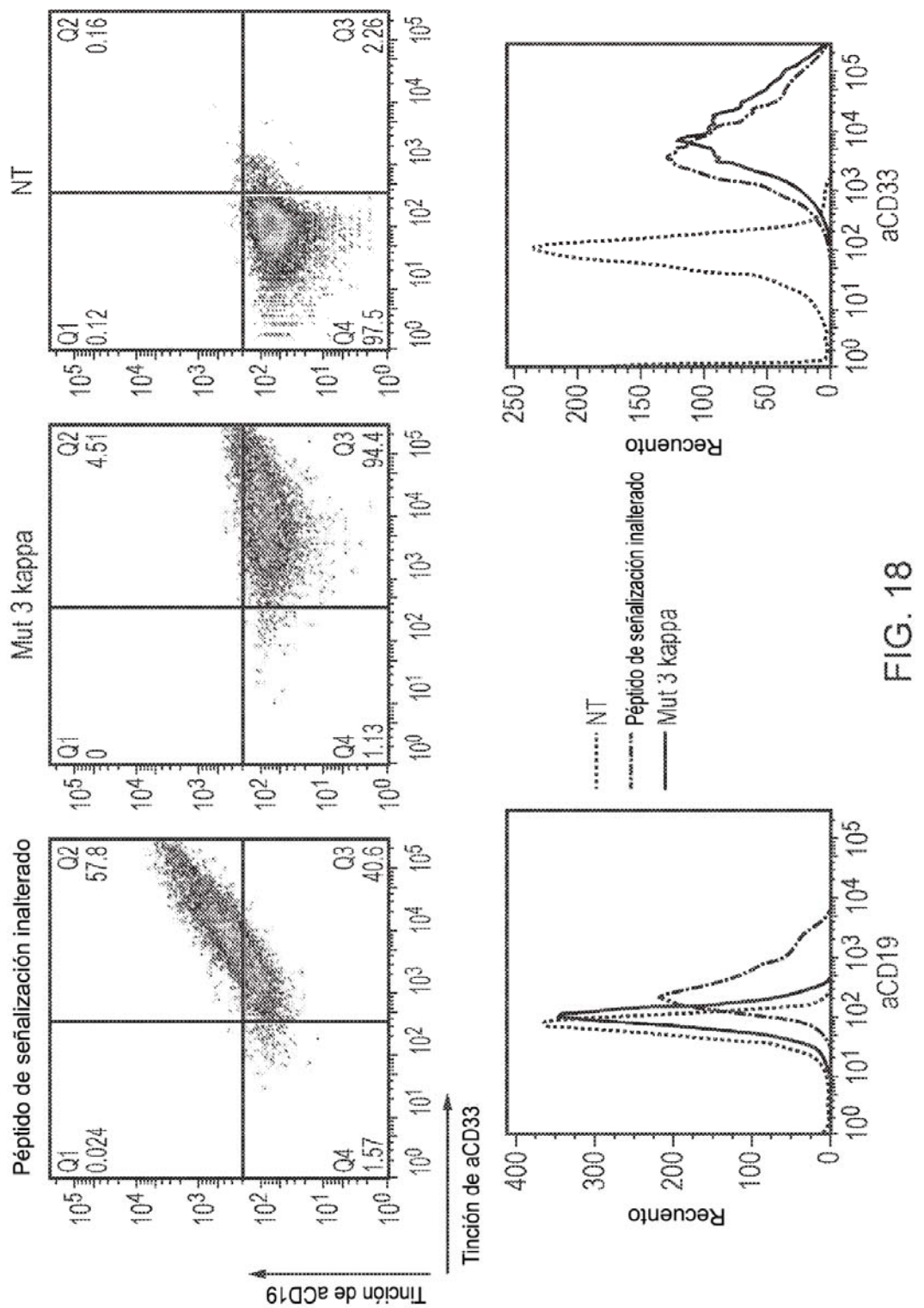
NT
Mut 3 kappa
Péptido de señalización inalterado
Q1 0.12
Q2 0.16
Q4 97.5
Q3 2.26
Q1 0
Q2 4.51
Q4 1.13
Q3 94.4
Q1 0.024
Q2 57.8
Q4 1.57
Q3 40.6
Tinción de aCD19
Tinción de aCD33
NT
Péptido de señalización inalterado
Mut 3 kappa
Recuento
aCD19
aCD33

FIG. 18

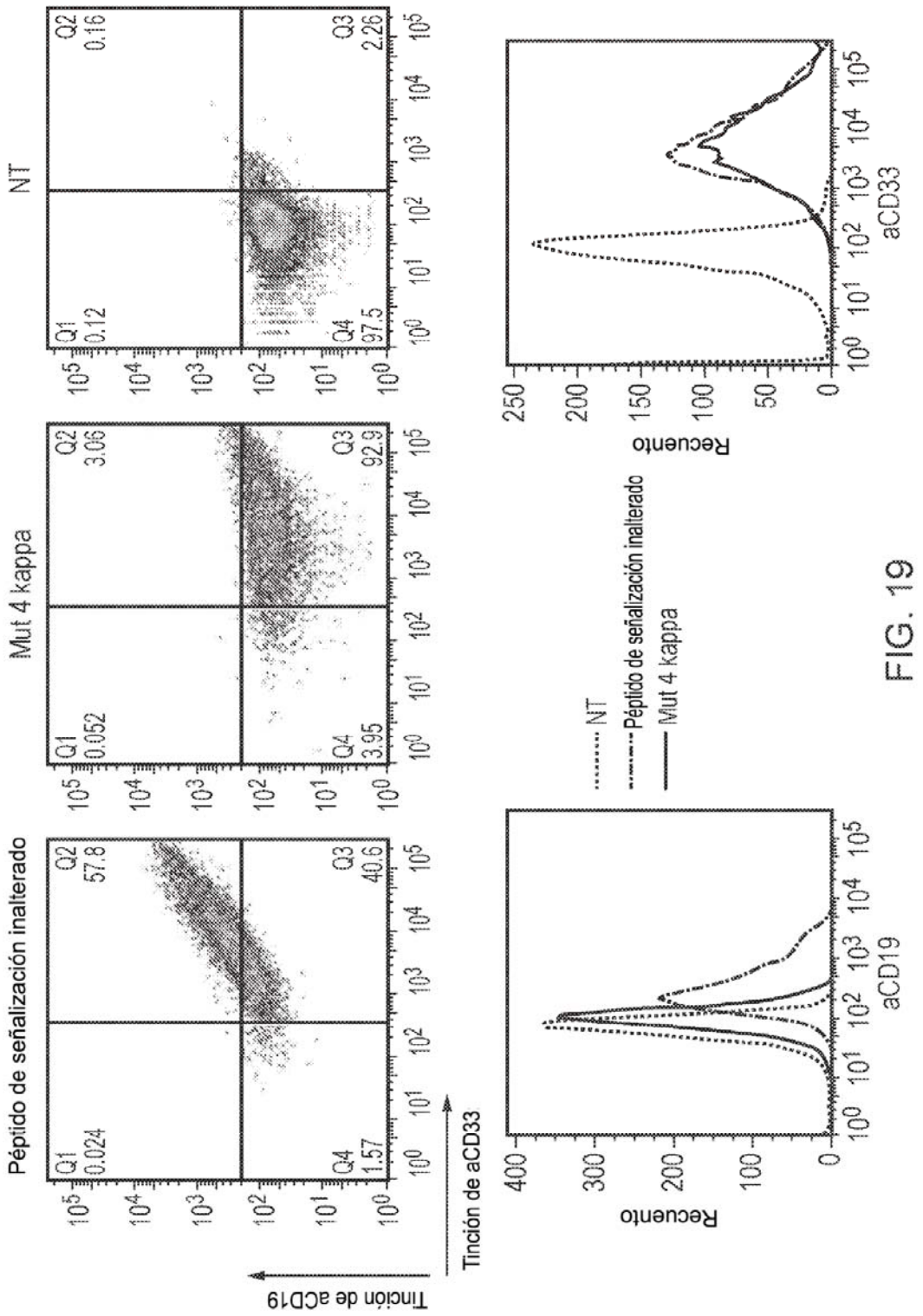
Péptido de señalización inalterado
Mut 4 kappa
NT
Tinción de aCD19
Tinción de aCD33
Q1 0.024
Q2 57.8
Q4 1.57
Q3 40.6
Q1 0.052
Q2 3.06
Q4 3.95
Q3 92.9
Q1 0.12
Q2 0.16
Q4 97.5
Q3 2.26
Recuento
aCD19
aCD33
NT
Péptido de señalización inalterado
Mut 4 kappa

FIG. 19