(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 781 175**

(51) Int. CI.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2015 PCT/US2015/043219**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16019300**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2015 E 15753252 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 3174546**

(54) Título: **Subconjunto optimizado de células T que contienen un receptor de antígeno quimérico**

(30) Prioridad:

31.07.2014 US 201462031699 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.08.2020

(73) Titular/es:

NOVARTIS AG (50.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH y
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (50.0%)

(72) Inventor/es:

GUEDAN CARRIO, SONIA;
JUNE, CARL H.;
POSEY, AVERY D. y
SCHOLLER, JOHN

(74) Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

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

Subconjunto optimizado de células T que contienen un receptor de antígeno quimérico

[0001] La presente solicitud reivindica la prioridad de US nº de serie 62/031.699 presentada el 31 de julio de 2014.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud contiene una lista de secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 28 de julio de 2015, se denomina N2067-70660WO_SL.txt y tiene 174,225 bytes de tamaño.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0003] La presente invención se refiere, en general, al uso de células T diseñadas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) para tratar una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno de tumor, por ejemplo, en el que CAR está optimizado para las células T del subconjunto de células T en el que se se proporciona.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0004] El desarrollo de células T que se modifican genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) ha abierto la puerta para muchas nuevas terapias potenciales para enfermedades, por ejemplo, cánceres. Generalmente, los CAR comprenden un dominio de unión a antígeno extracelular y un dominio intracelular. La composición exacta del dominio intracelular puede proporcionar características únicas al CAR y a la población de células que expresan CAR.

[0005] Las células T redirigidas para expresar CAR han mostrado una eficacia notable en el tratamiento de algunos tumores malignos de células B. El reconocimiento de diferentes tipos de cáncer utilizando células T redirigidas ha mostrado cierta actividad antitumoral prometedora, pero la actividad era limitada por la mala persistencia del producto de células T CAR infundido. Por lo tanto, hay una necesidad de procedimientos y composiciones para aumentar la persistencia y la actividad anti-tumoral de las células T CAR redirigidas para el tratamiento de enfermedades.

[0006] Moeller et al. Blood (2005); 106 (9): 2995-3003 se refiere a la transferencia adoptiva de células T auxiliares CD4+ modificadas genéticamente con inducción de rechazo del tumor.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

[0007] La presente descripción se basa en el sorprendente descubrimiento de que cuando los subconjuntos de células T, por ejemplo, células T CD4+ y CD8+, se diseñan para expresar los CAR que contienen diferentes dominios de señalización intracelular, se pueden modular la persistencia y la actividad anti-tumoral de células T que expresan CAR infusionadas. Por consiguiente, la presente descripción describe procedimientos y composiciones de células T CD4+ y CD8+ que expresan CAR que contienen combinaciones específicas de los dominios de señalización intracelular que se pueden utilizar para aumentar la persistencia y la actividad anti-tumoral de células T que expresan CAR infusionadas para tratar un sujeto que tiene una enfermedad, por ejemplo, un cáncer.

[0008] En un aspecto, en el presente documento se describe una célula T CD4+ para usar en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer, en el que la célula T CD4+ comprende un CAR (el CAR^{CD4+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular;
en el que el sujeto ha recibido, recibe o va a recibir:
una célula T CD8+ que comprende un CAR (el CAR^{CD8+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular;
en el que el CAR^{CD4+} y el CAR^{CD8+} se diferencian entre sí.

[0009] En un aspecto relacionado, en el presente documento se describe una célula T CD8+ para usar en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer, en el que la célula T CD8+ comprende un CAR (el CAR^{CD8+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular;
en el que el sujeto ha recibido, recibe o va a recibir:

una célula T CD4+ que comprende un CAR (el CAR^{CD4+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular;
en el que el CAR^{CD4+} y el CAR^{CD8+} se diferencian entre sí.

[0010] En un aspecto relacionado, en el presente documento se describe un procedimiento de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, que comprende administrar a dicho sujeto, una cantidad eficaz de:
1) una célula T CD4+ que comprende un CAR (el CAR^{CD4+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular; y
2) una célula T CD8+ que comprende un CAR (el CAR^{CD8+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular;
en el que el CAR^{CD4+} y el CAR^{CD8+} se diferencian entre sí.
En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular del CAR^{CD4+} difiere del dominio de señalización intracelular del CAR^{CD8+}. En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un primer dominio coestimulador de señalización no presente en el CAR^{CD8+}. En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un primer dominio coestimulador de señalización y el CAR^{CD8+} comprende un segundo dominio coestimulador de señalización. En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un primer dominio coestimulador de señalización no presente en el CAR^{CD8+} y el CAR^{CD8+} comprende un segundo dominio coestimulador de señalización no presente en el CAR^{CD4+}. En un ejemplo, el dominio de unión a antígeno del CAR^{CD4+} difiere del dominio de unión a antígeno del CAR^{CD8+}, por ejemplo, son diferentes dominios de unión a antígeno, al mismo o a diferentes antígenos.
En un ejemplo, el procedimiento de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, comprende además administrar al sujeto,
3) una segunda célula T CD8+ que comprende un CAR (el segundo CAR^{CD8+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular,
en el que el CAR^{CD4+}, el CAR^{CD8+} y el segunda CAR^{CD8+} difieren entre sí.

[0011] En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular del CAR^{CD8+} difiere del dominio de señalización intracelular del segundo CAR^{CD8+}. En un ejemplo, el CAR^{CD8+} comprende un primer dominio coestimulador de señalización no presente en el segundo CAR^{CD8+}. En un ejemplo, el CAR^{CD8+} comprende un primer dominio coestimulador de señalización y el segunda CAR^{CD8+} comprende un segundo dominio coestimulador de señalización. En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un primer dominio coestimulador de señalización no presente en el CAR^{CD8+} y el CAR^{CD8+} comprende un segundo dominio coestimulador de señalización no presente en el CAR^{CD4+}. En un ejemplo, el dominio de unión a antígeno del CAR^{CD8+} difiere del dominio de unión a antígeno del segundo CAR^{CD8+}, por ejemplo, son diferentes dominios de unión a antígeno, al mismo o a diferentes antígenos. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular del CAR^{CD4+}, el dominio de señalización intracelular del CAR^{CD8+}, y el dominio de señalización intracelular del segundo CAR^{CD8+}, difieren entre sí. En un ejemplo, cada uno de los CAR^{CD4+}, CAR^{CD8+} y segundo CAR^{CD8}, comprende un dominio coestimulador de señalización no presente en cualquiera de los otros. En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio ICOS. En un ejemplo, el dominio ICOS comprende la secuencia de SEQ ID NO: 46.

[0012] En un aspecto, en el presente documento se describe un procedimiento de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, que comprende, administrar a dicho sujeto, una cantidad eficaz de:
1) una célula T CD4+ que comprende un CAR (el CAR^{CD4+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de ICOS; y
2) una célula T CD8+ que comprende un CAR (el CAR^{CD8+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular que difiere de un dominio de señalización intracelular en CAR^{CD4+}, y, opcionalmente, en el que el CAR^{CD8+} no comprende un dominio ICOS; y opcionalmente,
3) una segunda célula T CD8+ que comprende un CAR (el segundo CAR^{CD8+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular, en el que el segundo CAR^{CD8+} comprende un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio coestimulador de señalización, no presente en el CAR^{CD8+}, y, opcionalmente, no comprende un dominio de señalización ICOS.

[0013] En un ejemplo, el CAR^{CD8+} no comprende un dominio ICOS.

[0014] En un ejemplo, el tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, comprende proporcionar una inmunidad anti-tumoral en el sujeto.

[0015] En un ejemplo, el tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, comprende la estimulación de una respuesta inmunitaria mediada por células T a una población de células o tejido diana en el sujeto. En un ejemplo, el sujeto se trata para una enfermedad, trastorno o afección asociada con, la expresión, por ejemplo, la expresión elevada, de un antígeno de tumor.

[0016] En un ejemplo, el procedimiento de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, que comprende además administrar al sujeto,
3) un segundo célula T CD8+ que comprende un CAR (el segundo CAR^{CD8+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular, en el que el segundo CAR^{CD8+} no comprende un dominio de señalización ICOS y comprende un dominio de señalización intracelular no presente en el CAR^{CD8+}.

[0017] En un ejemplo, el procedimiento comprende administrar:
una segunda célula T CD8+ que comprende un CAR (el segundo CAR^{CD8+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular, en el que el segundo CAR^{CD8+} comprende un dominio de señalización intracelular no presente en el CAR^{CD8+}, y, opcionalmente, no comprende un dominio ICOS.

[0018] En un ejemplo, el procedimiento de tratamiento de un sujeto comprende administrar
una célula T CD4+ que comprende un CAR^{CD4+} que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular primaria, por ejemplo, un dominio CD3zeta (y un dominio ICOS);
una célula T CD8+ que comprende un CAR^{CD8+} que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular primaria, por ejemplo, un dominio CD3zeta, y un primer dominio coestimulador de señalización, por ejemplo, un dominio 4-1BB; y
una segundo célula T CD8+ que comprende un segundo CAR^{CD8+} que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular primaria, por ejemplo, un dominio CD3zeta, y un segundo dominio coestimulador de señalización, por ejemplo, un dominio CD28, en el que el segundo CAR^{CD8+} no comprende un dominio de señalización ICOS
en el que dichos primero y segundo dominios de señalización coestimuladora son diferentes.

[0019] En un ejemplo, la célula T CD4+ que comprende un CAR^{CD4+} persiste en el sujeto durante al menos 10, 15, 30, 45, 60, o 90 días después de la administración.

[0020] En un ejemplo, la célula T CD8+ que comprende un CAR^{CD8+} persiste en el sujeto durante al menos 10, 15, 30, 45, 60, o 90 días después de la administración.

[0021] En un ejemplo, el procedimiento comprende además administrar una segunda célula T CD8+ que comprende un segundo CAR^{CD8+}, en el que las segunda célula T CD8+ persiste en el sujeto durante al menos 10, 15, 30, 45, 60, o 90 días después de administración.

[0022] En un ejemplo, el procedimiento de tratamiento de un sujeto comprende administrar una preparación de células T al sujeto, en el que al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, o 80% de las células T, o células, en la preparación son células T CD4+ que comprenden un CAR^{CD4+}.

[0023] En un ejemplo, el procedimiento de tratamiento de un sujeto comprende administrar una preparación de células T al sujeto, en el que al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, o 80% de las células T, o células, en la preparación son células T CD8+ que comprenden un CAR^{CD8+}.

[0024] En un ejemplo, el procedimiento de tratamiento de un sujeto comprende administrar una preparación de células T al sujeto, en el que al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, o 80% de las células T, o células, en la preparación son células T CD4+ que comprenden un CAR^{CD4+}; y al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, o 80% de las células T, o células, en la preparación son células T CD8+ que comprenden un CAR^{CD8+} o un segundo CAR^{CD8+} (entendiéndose que las células totales no excedan del 100%).

[0025] En un ejemplo, el procedimiento de tratamiento de un sujeto comprende administrar una preparación de células T al sujeto, en el que de 10 a 70% de las células T, o células, en la preparación son células T CD4+ que comprenden un CAR^{CD4+}; y de 10 a 70% de las células T, o células, en la preparación son células T CD8+ que comprenden un CAR^{CD8+}o un segundo CAR^{CD8+}(entendiéndose que las células totales no excedan el 100%).

[0026] En un ejemplo, el procedimiento de tratamiento de un sujeto comprende administrar una preparación de células T al sujeto, en el que al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, o 80% de las células T, o células, en la preparación son células T CD4+ que comprenden un CAR^{CD4+}; al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, o 80% de las células T, o células, en la preparación son células T CD8+ que comprenden un CAR^{CD8+}; y al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, o 80% de las células T, o células, en la preparación son células T CD8+ que comprenden un segundo CAR^{CD8+} (entendiéndose que las células totales no exceden el 100%).

[0027] En un ejemplo, la célula T CD4+ que comprende el CAR^{CD4+} es una célula T autóloga. En un ejemplo, la célula T CD8+ que comprende el CAR^{CD8+} es una célula T autóloga. En un ejemplo, la célula T CD4+ que comprende el CAR^{CD4+} y la células T CD8+ que comprende el CAR^{CD8+} son células T autólogas. En un ejemplo, la administración de una segunda célula T CD8+ que comprende un segundo CAR^{CD8+}, en el que la segundo célula T CD8+ es una célula T autóloga.

[0028] En un ejemplo, la célula T CD4+ que comprende el CAR^{CD4+} es una célula T alogénico. En un ejemplo, la célula T CD8+ que comprende el CAR^{CD8+} es una célula T alogénica. En un ejemplo, la célula T CD4+ que comprende el CAR^{CD4+} y la célula T CD8+ que comprende el CAR^{CD8+} son células T alogénicas. En un ejemplo, el procedimiento comprende además administrar una segundo célula T CD8+ que comprende un segundo CAR^{CD8+}, en el que la segunda célula T CD8+ es una célula T alogénica.

[0029] En un ejemplo, la célula T CD4+ que comprende el CAR^{CD4+} es una célula T autóloga y la célula T CD8+ que comprende el CAR^{CD8+} es una célula T alogénica.

[0030] En un ejemplo, la célula T CD4+ que comprende el CAR^{CD4+} es una célula T alogénica y la célula T CD8+ que comprende el CAR^{CD8+} es una célula T autóloga.

[0031] En un ejemplo, el procedimiento comprende además la evaluación del sujeto por un efecto secundario de dicho tratamiento. En un ejemplo, dicho efecto secundario comprende síndrome de dificultad respiratoria aguda, neutropenia febril, hipotensión, encefalopatía, transaminitis hepática, convulsiones, o el síndrome de activación de macrófagos.

[0032] En un ejemplo, el procedimiento comprende además el tratamiento del sujeto que tiene un efecto secundario con el agente anti-citocina, por ejemplo, un antagonista del factor de necrosis tumoral, por ejemplo, una fusión TNF-Ig, por ejemplo, etanercept, un antagonista de IL-6, por ejemplo, un antagonista del receptor de IL6, por ejemplo, un anticuerpo anti-receptor de IL6, por ejemplo, tocilizumab, o un corticosteroide. En un ejemplo, el tratamiento del sujeto que tiene un efecto secundario comprende administrar un anticuerpo anti-receptor de IL6 al sujeto.

[0033] En un ejemplo, el sujeto es un humano.

[0034] Las células T CD4+ y células T CD8+ que expresan CAR descritas en el presente documento pueden administrarse simultáneamente, en la misma composición o en composiciones separadas, o secuencialmente. En un ejemplo, las células T CD4+ que expresan CAR se administran antes que las células T CD8+ que expresan CAR, y en un ejemplo, las células T CD8+ que expresan CAR se administran antes que las células T CD4+ que expresan CAR.

[0035] Los siguientes ejemplos describen cualquiera de CAR^{CD4+}, o célula T CD4+ que comprende el CAR^{CD4+}, el CAR^{CD8+} o la célula T CD8+ que comprende el CAR $^{CD8+}$, o el segunda CAR^{CD8+}, o la segunda célula T CD8+ que comprende el segundo CAR^{CD8+}, comprendidos en cualquiera de los procedimientos, composiciones, o kits descritos en el presente documento.

[0036] En un ejemplo, el CAR^{CD4+} no incluye un dominio 4-1BB.

[0037] En un ejemplo, el CAR^{CD4+} no incluye un dominio CD28.

[0038] En un ejemplo, el CAR^{CD4+} no incluye un dominio coestimulador distinto del dominio ICOS.

[0039] En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio de señalización intracelular primaria, por ejemplo, un dominio de señal primaria de la Tabla 4, por ejemplo, un dominio CD3zeta. En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio CD3zeta pero no incluye un dominio coestimulador distinto del dominio ICOS.

[0040] En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un segundo dominio coestimulador de señalización, por ejemplo, de

la Tabla 5.

[0041] En un ejemplo, el CAR^{CD8+} comprende un dominio de señalización intracelular primaria, por ejemplo, un dominio de señal primaria de la Tabla 4, por ejemplo, un dominio CD3zeta y un dominio coestimulador de señalización, por ejemplo, de la Tabla 5.

[0042] En un ejemplo, el CAR^{CD8+} comprende un segundo dominio coestimulador de señalización, por ejemplo, de la Tabla 5.

[0043] En un ejemplo, el CAR^{CD8+} comprende un dominio CD3zeta.

[0044] En un ejemplo, el CAR^{CD8+} comprende un dominio coestimulador de señalización distinto de ICOS, por ejemplo, de la Tabla 5, por ejemplo, 41BB o CD28.

[0045] En un ejemplo, el CAR^{CD8+} comprende un dominio 4-1BB.

[0046] En un ejemplo, el CAR^{CD8+} comprende un dominio CD3zeta y un dominio 4-1BB.

[0047] En un ejemplo, el CAR^{CD8+} comprende un dominio CD28.

[0048] En un ejemplo, el CAR^{CD8+} comprende un dominio CD3zeta y un dominio CD28.

[0049] En un ejemplo, el CAR^{CD8+} comprende un dominio CD3zeta, un dominio 41BB y un dominio CD28.

[0050] En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio CD3zeta; y el CAR^{CD8+} comprende un dominio CD3zeta y un dominio 4-1BB.

[0051] En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio CD3zeta; y el CAR^{CD8+} comprende un dominio CD3zeta y un dominio CD28.

[0052] En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio CD3zeta (y un dominio ICOS); y el CAR^{CD8+} comprende un dominio CD3zeta, un dominio 4-1BB y un dominio CD28.

[0053] En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio CD3zeta (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20) y un dominio ICOS (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 46); y el CAR^{CD8+} comprende un dominio CD3zeta (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20) y un dominio 4-1BB (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 14). En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio CD3zeta (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20); y el CAR^{CD8+} comprende un dominio CD3zeta (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20). En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio ICOS (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 46); y el CAR^{CD8+} comprende un dominio 4-1BB (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 14). En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio CD3zeta (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20); y el CAR^{CD8+} comprende un dominio CD3zeta (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20) y un dominio 4-1BB (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 14). En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio ICOS (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 46); y el CAR^{CD8+} comprende un dominio CD3zeta (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20) y un dominio 4-1BB (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 14). En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio CD3zeta (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20) y un dominio ICOS (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 46); y el CAR^{CD8+} comprende un dominio CD3zeta (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20). En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio CD3zeta (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20) y un dominio ICOS (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 46); y el CAR^{CD8+} comprende un dominio 4-1BB (por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 14).

[0054] En un ejemplo, el segundo CAR^{CD8+} no comprende un dominio ICOS.

[0055] En un ejemplo, el segundo CAR^{CD8+} comprende un dominio de señalización intracelular primaria, por ejemplo, un dominio de señal primaria de la Tabla 4, por ejemplo, un dominio CD3zeta.

[0056] En un ejemplo, el segundo CAR^{CD8+} comprende un dominio coestimulador de señalización distinto de ICOS, por ejemplo, de la Tabla 5, por ejemplo, un dominio 4-1BB.

[0057] En un ejemplo, el segundo CAR^{CD8+} comprende un dominio coestimulador de señalización distinta de ICOS, por ejemplo, de la Tabla 5, por ejemplo, un dominio CD28.

[0058] En un ejemplo, el segundo CAR^{CD8+} comprende un dominio CD3zeta y un dominio 4-1BB.

[0059] En un ejemplo, el segundo CAR^{CD8+} comprende un dominio CD3zeta y un dominio CD28.

[0060] En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio CD3zeta (y un dominio ICOS); el CAR^{CD8+} comprende un dominio CD3zeta y un dominio 4-1BB; y el segundo CAR^{CD8+} comprende un dominio CD3zeta y un dominio CD28.

[0061] En un ejemplo, la célula CD4+ es una célula polarizada por Th17. En un ejemplo, la célula CD4+ produce IL-17A y/o IFNγ. En un ejemplo, la célula CD4+ expresa IL-23R y/o CD161 en la superficie celular.

[0062] En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio variable de anticuerpo, un scFv, o un nanoanticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En un ejemplo, el dominio de unión al antígeno específico para un antígeno tumoral seleccionado de CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, glicolípidos F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, y cualquier combinación de los mismos. En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno descrito en el presente documento, por ejemplo, un antígeno que aparece en la Tabla 2. En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio de unión a antígeno de la Tabla 2.

[0063] En un ejemplo, el CAR^{CD8+} comprende un dominio variable de anticuerpo, un scFv, o un nanoanticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En un ejemplo, el CAR^{CD8+} comprende un dominio de unión a antígeno específico para un antígeno tumoral seleccionado de CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, glicolípidos F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, y cualquier combinación de los mismos. En un ejemplo, el CAR^{CD8+} comprende un dominio de unión a antígeno que se une una célula de cáncer, por ejemplo, que se une a un antígeno que se describe en la Tabla 2. En un ejemplo, el CAR^{CD8+} comprende un dominio de unión a antígeno de la Tabla 2.

[0064] En un ejemplo, el CAR^{CD4+} y el CAR^{CD8+} comprenden cada uno un dominio de unión a antígeno que se une una célula de cáncer, por ejemplo, que se une a un antígeno que se describe en la Tabla 2. En un ejemplo, cada uno de los CAR^{CD4+} y CAR^{CD8+} comprende un dominio de unión a antígeno que se une al mismo antígeno. En un ejemplo, el CAR^{CD4+} y el CAR^{CD8+} comprende cada uno un dominio de unión a antígeno de la Tabla 2. En un ejemplo, cada uno de los CAR^{CD4+} y CAR^{CD8+} comprende el mismo dominio de unión a antígeno.

[0065] En un ejemplo, se administra una segunda célula T CD8+ que comprende un segundo CAR^{CD8+}, y el segundo CAR^{CD8+} comprende un dominio de unión a antígeno que se une a una célula de cáncer, por ejemplo, que se une a un antígeno que se describe en la Tabla 2.

[0066] En un ejemplo, se administra una segunda célula T CD8+ que comprende un segundo CAR^{CD8+}, y el segundo CAR^{CD8+} comprende un dominio de unión a antígeno de la Tabla 2.

[0067] En un ejemplo, se administra una segunda célula T CD8+ que comprende un segundo CAR^{CD8+}, y los CAR^{CD4+}, CAR^{CD8+}, y el segunda CAR^{CD8+} comprenden cada uno un dominio de unión a antígeno que se une a una célula de cáncer, por ejemplo, que se une a un antígeno que se describe en la Tabla 2.

[0068] En un ejemplo, se administra una segunda célula T CD8+ que comprende un segundo CAR^{CD8+} y cada uno de los CAR^{CD4+}, CAR $^{CD8+}$ y segundo CAR^{CD8+} comprende un dominio de unión a antígeno que se une al mismo antígeno.

[0069] En un ejemplo, los CAR^{CD4+}, CAR^{CD8+} y el segundo CAR^{CD8+} comprenden cada uno un dominio de unión a antígeno de la Tabla 2.

[0070] En un ejemplo, se administra una segunda célula T CD8+ que comprende un segundo CAR^{CD8+} y en el que cada uno de los CAR^{CD4+}, CAR^{CD8+} y segundo CAR^{CD8+} comprenden el mismo dominio de unión a antígeno.

[0071] En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio ICOS. En un ejemplo, el CAR^{CD8+} no comprende un dominio ICOS. En un ejemplo, el segundo CAR^{CD8+} no comprende un dominio de señalización ICOS y comprende un dominio de señalización intracelular no presente en el CAR^{CD8+}.

[0072] En los ejemplos, el dominio de señalización intracelular de una molécula de CAR que se describe en el presente documento comprende un dominio coestimulador. En los ejemplos, el dominio de señalización intracelular de la molécula de CAR comprende un dominio de señalización primaria. En los ejemplos, el dominio de señalización intracelular de la molécula de CAR aislada un dominio coestimulador y un dominio de señalización primaria.

[0073] En un ejemplo, el dominio coestimulador comprende un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en molécula CMH de clase I, proteínas receptoras de TNF, proteínas similares a una inmunoglobulina, receptores de citocinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señales (proteínas SLAM), receptores de células NK activadoras, BTLA, un receptor de ligando Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 41BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4,

CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly1 08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/CBP, CD19a, y un ligando que se une específicamente con CD83. En los ejemplos, el dominio coestimulador comprende 4-1BB, CD27, CD28, o ICOS.

[0074] En un ejemplo, el dominio coestimulador 4-1BB comprende una secuencia de SEQ ID NO: 14. En un ejemplo, el dominio coestimulador 4-1BB comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En un ejemplo, el dominio coestimulador 4-1BB es codificado por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 15, o una secuencia con un 95-99% de identidad de la misma.

[0075] En un ejemplo, el dominio coestimulador CD27 comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16. En un ejemplo, el dominio coestimulador CD27 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos uno, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. En un ejemplo, el dominio coestimulador CD27 es codificado por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 17, o una secuencia con un 95-99% de identidad de la misma.

[0076] En un ejemplo, el dominio coestimulador CD28 comprende una secuencia de SEQ ID NO: 44. En un ejemplo, el dominio coestimulador CD28 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos uno, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44. En un ejemplo, el dominio coestimulador CD28 es codificado por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 45, o una secuencia con un 95-99% de identidad de la misma.

[0077] En un ejemplo, el dominio coestimulador ICOS de tipo salvaje comprende una secuencia de SEQ ID NO: 40. En un ejemplo, el dominio coestimulador ICOS de tipo salvaje comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos uno, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40. En un ejemplo, el dominio coestimulador ICOS de tipo salvaje es codificado por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 41, o una secuencia con un 95-99% de identidad de la misma.

[0078] En un ejemplo, el dominio coestimulador ICOS mutante de Y a F comprende una secuencia de SEQ ID NO: 46. En un ejemplo, el dominio coestimulador ICOS mutante de Y a F comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos uno, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46. En un ejemplo, el dominio coestimulador ICOS mutante de Y a F es codificado por una secuencia de ácido nucleico con un 95-99% de identidad con una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 41 (en la que la SEQ ID NO: 41 codifica ICOS de tipo salvaje).

[0079] En casos, el dominio de señalización primaria comprende un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En casos, el dominio de señalización funcional de CD3 zeta comprende la SEQ ID NO: 18 (CD3 zeta mutante) o SEQ ID NO: 20 (CD3 zeta humano de tipo salvaje).

[0080] En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular de un CAR, por ejemplo, un CAR^{CD4+} o un CAR^{CD8+}, comprende un dominio de señalización funcional de CD27 y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular de un CAR, por ejemplo, un CAR^{CD4+} o un CAR^{CD8+}, comprende un dominio de señalización funcional de CD28 y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular de un CAR, por ejemplo, un CAR^{CD4+} o un CAR^{CD8+}, comprende un dominio de señalización funcional de ICOS y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular de un CAR, por ejemplo, un CAR^{CD4+} o un CAR^{CD8+}, comprende un dominio de señalización funcional de 41BB y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta.

[0081] En un ejemplo, una célula CART descrita en el presente documento muestra una persistencia mejorada en comparación con una célula T de control, por ejemplo, una célula T de un tipo diferente (por ejemplo, CD8+ o CD4+) que expresa el mismo CAR. En algunos casos, una célula T CD4+ comprende un CAR descrito en el presente documento, cuyo CAR comprende un dominio de señalización intracelular adecuado para (por ejemplo, optimizado para, por ejemplo, que lleva a la persistencia mejorada en) una célula T CD4+, por ejemplo, un dominio ICOS. En

algunos casos, una célula T CD8+ comprende un CAR descrito en el presente documento, cuyo CAR comprende un dominio de señalización intracelular adecuado para (por ejemplo, optimizado para, por ejemplo, que lleva a una persistencia mejorada de) una célula T CD8+, por ejemplo, un dominio 4-1BB, un dominio CD28 u otro dominio coestimulador distinto de un dominio ICOS.

[0082] En un aspecto, en el presente documento se describe una composición, por ejemplo, una composición farmacéuticamente aceptable, o conjunto de composiciones, por ejemplo, un conjunto de composiciones farmacéuticamente aceptables, que comprenden uno o más de los siguientes componentes:
1) una célula T $CD4^+$ que comprende un CAR (el CAR^{CD4+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular; y
2) una célula T $CD8^+$ que comprende un CAR (el CAR^{CD8+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular; y,
en la que el CAR^{CD4+}y el CAR^{CD8+} difieren entre sí.
En un ejemplo, la composición, o conjunto de composiciones, comprende además:
3) una segunda célula T $CD8^+$ que comprende un CAR (el segundo CAR^{CD8+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular,
en la que el segundo CAR^{CD8+} difiere del CAR^{CD4+} y del CAR^{CD8+}.

[0083] En un ejemplo, la composición, o conjunto de composiciones, comprende una pluralidad de componentes 1), 2) y 3).

[0084] En un ejemplo, la composición, o conjunto de composiciones, comprende una composición que comprende el componente 1).

[0085] En un ejemplo, la composición, o conjunto de composiciones, comprende una composición que comprende el componente 2).

[0086] En un ejemplo, la composición, o conjunto de composiciones, comprende una composición que comprende el componente 3).

[0087] En un ejemplo, la composición, o conjunto de composiciones, comprende una composición que comprende los componentes 1) y 2).

[0088] En un ejemplo, la composición, o conjunto de composiciones, comprende una composición que comprende los componentes 1) y 3).

[0089] En un ejemplo, la composición, o conjunto de composiciones, comprende una composición que comprende 2) y 3).

[0090] En un ejemplo, la composición, o conjunto de composiciones, comprende una composición que comprende los componentes 1), 2) y 3).

[0091] En un ejemplo, la composición, o conjunto de composiciones, comprende un conjunto de composiciones, comprendiendo el conjunto una composición que comprende el componente 1) y una composición que comprende el componente 2).

[0092] En un ejemplo, la composición, o conjunto de composiciones, comprende un conjunto de composiciones, comprendiendo el conjunto una composición que comprende el componente 1) y una composición que comprende el componente 3).

[0093] En un ejemplo, la composición, o conjunto de composiciones, comprende un conjunto de composiciones, comprendiendo el conjunto una composición que comprende el componente 2) y una composición que comprende el componente 3).

[0094] En un ejemplo, la composición, o conjunto de composiciones, comprende un conjunto de composiciones, comprendiendo el conjunto una composición que comprende el componente 1), una composición que comprende el componente 2), y una composición que comprende el componente 3).

[0095] En un ejemplo, la composición es una composición farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo, el conjunto de composiciones comprende una o más (por ejemplo, todas) las composiciones farmacéuticamente

aceptables.

[0096] En un aspecto, en el presente documento se describe una composición, por ejemplo, una composición farmacéuticamente aceptable, o conjunto de composiciones, por ejemplo, un conjunto de composiciones farmacéuticamente aceptables, que comprende uno, o más, o la totalidad de una célula T $CD4^+$ que comprende un CAR^{CD4+}, una célula T $CD8^+$ de células T que comprende un CAR^{CD8+}, y una segunda célula T $CD8^+$ que comprende un segundo CAR^{CD8+}, para uso como medicamento.

[0097] En un aspecto, en el presente documento se describe una composición, por ejemplo, una composición farmacéuticamente aceptable, o conjunto de composiciones, por ejemplo, un conjunto de composiciones farmacéuticamente aceptables, que comprende uno, o más, o la totalidad de una célula T $CD4^+$ que comprende un CAR^{CD4+}, una célula T $CD8^+$ de células T que comprende un CAR^{CD8+}, y una segunda célula T $CD8^+$ que comprende un segundo CAR^{CD8+}, para uso como medicamento en el tratamiento de un trastorno descrito en el presente documento, por ejemplo, cáncer.

[0098] Cualquiera de los CAR^{CD4+}, CAR^{CD8+} o el segundo CAR^{CD8+} descritos en el presente documento pueden usarse en las composiciones o conjunto de composiciones descritas en el presente documento.

[0099] En un aspecto, en el presente documento se describe un kit que comprende, uno, o más, o todos de los siguientes componentes:
1) un ácido nucleico que comprende la secuencia que codifica un CAR^{CD4+} que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular; y
2) un ácido nucleico que comprende la secuencia que codifica un CAR^{CD8+} que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular; y,
en el que el CAR^{CD4+} y el CAR^{CD8+} difieren entre sí.
En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio ICOS. En un ejemplo, el CAR^{CD8+} no comprende un dominio ICOS.
En un ejemplo, el kit además comprende además:
3) un ácido nucleico que comprende la secuencia que codifica un segundo CAR^{CD8+} que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular,
en el que el segundo CAR^{CD8+} difiere del CAR^{CD4+} y el CAR^{CD8+}. En un ejemplo, el segundo CAR^{CD8+} no comprende un dominio de señalización ICOS y comprende un dominio de señalización intracelular no está presente en el CAR^{CD8+}.

[0100] En un ejemplo, el kit comprende el componente 1).

[0101] En un ejemplo, el kit comprende el componente 2).

[0102] En un ejemplo, el kit comprende el componente 3).

[0103] En un ejemplo, el kit comprende una pluralidad de componentes 1), 2) y 3).

[0104] En un ejemplo, el kit comprende los componentes 1) y 2).

[0105] En un ejemplo, el kit comprende 1) y 3).

[0106] En un ejemplo, el kit comprende 1), 2) y 3).

[0107] En un ejemplo, el kit comprende una pluralidad de componentes 1), 2) y 3) y cada componente de la pluralidad está dispuesto en un recipiente separado.

[0108] En un ejemplo, el kit comprende además un tampón.

[0109] En un ejemplo, el kit comprende además un reactivo útil para la introducción de uno de los componentes en una célula T, por ejemplo, un reactivo tampón o transfección.

[0110] En un ejemplo, el componente 1) comprende un vector viral, por ejemplo, un vector lentiviral.

[0111] En un ejemplo, el componente 2) comprende un vector viral, por ejemplo, un vector lentiviral.

[0112] En un ejemplo, el componente 3) comprende un vector viral, por ejemplo, un vector lentiviral.

[0113] En un aspecto, el kit descrito en el presente documento comprende uno, o más, o todos de los siguientes componentes:
1) una célula T $CD4^+$, o la preparación de la misma, que comprende un CAR (el CAR^{CD4+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular; y
2) una célula T $CD8^+$, o la preparación de la misma, que comprende un CAR (el CAR^{CD8+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular; y,
en el que el CAR^{CD4+} y el CAR^{CD8+} se diferencian entre sí. En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio ICOS. En un ejemplo, el CAR^{CD8+} no comprende un dominio ICOS.
En un ejemplo, el kit comprende además
3) una segunda célula T $CD8^+$, o la preparación de la misma, que comprende un CAR (el segundo CAR^{CD8+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular,
en el que el segundo CAR^{CD8+} difiere del CAR^{CD4+} y el CAR^{CD8+}. En un ejemplo, el segundo CAR^{CD8+} no comprende un dominio de señalización ICOS y comprende un dominio de señalización intracelular no presente en el CAR^{CD8+}.

[0114] En un ejemplo, la célula T $CD4^+$, o la preparación de la misma, y la célula T $CD8^+$, o la preparación de la misma, están dispuestos en un recipiente.

[0115] En un ejemplo, la célula T $CD4^+$, o la preparación de la misma, está dispuesta en un primer recipiente y la célula T $CD8^+$, o la preparación de la misma, está dispuesta en un segundo recipiente.

[0116] En un ejemplo, el kit comprende el componente 1).

[0117] En un ejemplo, el kit comprende el componente 2).

[0118] En un ejemplo, el kit comprende el componente 3).

[0119] En un ejemplo, el kit comprende una pluralidad de componentes 1), 2) y 3).

[0120] En un ejemplo, el kit comprende los componentes 1) y 2).

[0121] En un ejemplo, el kit comprende los componentes 1) y 3).

[0122] En un ejemplo, el kit comprende los componentes 1), 2) y 3).

[0123] En un ejemplo, cada componente del kit descrito en el presente documento se dispone en un recipiente separado.

[0124] En un aspecto, en el presente documento se describe un kit que comprende uno, o más o todos de un ácido nucleico que comprende la secuencia que codifica un CAR^{CD4+}, un ácido nucleico que comprende la secuencia que codifica un CAR^{CD8+}, y un ácido nucleico que comprende la secuencia que codifica un segundo CAR^{CD8+}, para usar como un medicamento.

[0125] En un aspecto, en el presente documento se describe un kit que comprende uno, o más o todos de un ácido nucleico que comprende la secuencia que codifica un CAR^{CD4+}, un ácido nucleico que comprende la secuencia que codifica un CAR^{CD8+}, y un ácido nucleico que comprende la secuencia que codifica un segundo CAR^{CD8+}, para usar como un medicamento en el tratamiento de un trastorno descrito en el presente documento, por ejemplo, cáncer.

[0126] En un aspecto, en el presente documento se describe un kit que comprende uno, o más o todos de una célula T $CD4^+$, o preparación de la misma, que comprende un CAR^{CD4+}, una célula T $CD8^+$, o la preparación de la misma, que comprende un CAR^{CD8+}, y una segunda célula T $CD8^+$, o la preparación de la misma, que comprende un segundo CAR^{CD8+} para usar como un medicamento.

[0127] En un aspecto, en el presente documento se describe un kit que comprende uno, o más o todos de una célula T $CD4^+$, o preparación de la misma, que comprende un CAR^{CD4+}, una célula T $CD8^+$, o la preparación de la misma, que comprende un CAR^{CD8+}, y una segunda célula T $CD8^+$, o la preparación de la misma, que comprende un segundo CAR^{CD8+} para usar como un medicamento en el tratamiento de un trastorno descrito en el presente

documento, por ejemplo, cáncer.

[0128] Cualquiera de los CAR^{CD4+}, CAR^{CD8+} o segundo CAR^{CD8+} descritos en el presente documento pueden usarse en el kit, o los componentes del kit, descritos en el presente documento.

[0129] En un ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, o 80% de las células T, o una preparación de las mismas, en la composición o kit descritos en el presente documento son células T CD4+ que comprenden un CAR^{CD4+}.

[0130] En un ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, o 80% de las células T, o una preparación de las mismas, en la composición o kit descritos en el presente documento son células T CD8+ que comprenden un CAR^{CD8+}.

[0131] En un ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, o 80% de las células T, o una preparación de las mismas, en la composición o kit descritos en el presente documento son células T CD4+ que comprenden un CAR^{CD4+}; y al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, o 80% de las células T, o una preparación de las mismas, en la composición o un kit descritos en el presente documento son células T CD8+ que comprenden un CAR^{CD8+} o un segundo CAR^{CD8+} (entendiéndose que las células totales no excedan el 100%).

[0132] En un ejemplo, al menos de 10 a 70% de las células T, o una preparación de las mismas, en la composición o kit descritos en el presente documento son células T CD4+ que comprenden un CAR^{CD4+}; y al menos de 10 a 70% de las células T, o una preparación de las mismas, en la composición o kit descritos en el presente documento son células T CD8+ que comprenden un CAR^{CD8+} o un segundo CAR^{CD8+} (entendiéndose que las células totales no excedan el 100%).

[0133] En un ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, o 80% de las células T, o una preparación de las mismas, en la composición o kit descritos en el presente documento son células T CD4+ que comprenden un CAR^{CD4+}; al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, o 80% de las células T, o una preparación de las mismas, en la composición o kit descritos en el presente documento son células T CD8+ que comprenden un CAR^{CD8+} y al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, o 80% de las células T, o una preparación de las mismas, en la composición o kit descritos en el presente documento son células T CD8+ que comprenden un segundo CAR^{CD8+} (entnendiéndose que las células totales no excedan el 100%).

[0134] En un aspecto, en el presente documento se describe un procedimiento de fabricación de una célula T CD4+ que comprende un CAR (un CAR^{CD4+}) y una célula T CD8+ que comprende un CAR (un CAR^{CD8+}) (o un kit o composición que comprende las mismas), comprendiendo el procedimiento:
proporcionanr una célula T CD4+ que comprende un CAR^{CD4+}, por ejemplo, mediante la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR^{CD4+} en una célula T CD4+;
proporcionar una célula T CD8+ que comprende un CAR^{CD8+}, por ejemplo, mediante la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR^{CD8+} en una célula T CD8+;
en el que,
el CAR^{CD4+} comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular; y
el CAR^{CD8+} comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular,
en el que el CAR^{CD4+} y el CAR^{CD4+} son diferentes. En un ejemplo, el CAR^{CD4+} comprende un dominio ICOS. En un ejemplo, el CAR^{CD8+} no comprende un dominio ICOS.

[0135] En un ejemplo, el procedimiento de fabricación de una célula T CD4+ que comprende un CAR (un CAR^{CD4+}) y una célula T CD8+ que comprende un CAR (un CAR^{CD8+}) (o un kit o composición que comprende las mismas) comprende:
a) proporcionar una célula T CD4+;
b) introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR^{CD4+} en la célula T CD4+ para proporcionar una célula T CD4+ que comprende un CAR^{CD4+};
c) proporcionar una célula T CD8+;
d) introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR^{CD8+} en la célula T CD8+ para proporcionar una célula T CD8+ que comprende un CAR^{CD8+}. En un ejemplo, c) se realiza antes de a). En un ejemplo, la etapa a) comprende la selección de una célula T CD4+, por ejemplo, mediante selección negativa o por clasificación de células. En un ejemplo, la etapa c) comprende la selección de una célula T CD8+, por ejemplo, mediante selección negativa o por clasificación de células. En un ejemplo, a) y c) se realizan simultáneamente.

[0136] En un ejemplo, el procedimiento de fabricación de una célula T CD4+ que comprende un CAR (un CAR^{CD4+})

y una célula T CD8+ que comprende un CAR (un CAR^{CD8+}) (o un kit o composición que comprende las mismas) comprende además e) Th 17 que polariza la célula T CD4+ o célula T CD4+ que comprende un CAR^{CD4+}.

[0137] En un ejemplo, el procedimiento comprende además la expansión de la célula T CD4+ para proporcionar la progenie de células T CD4+. En un ejemplo, el procedimiento comprende además la expansión de la célula T CD4+ que comprende un CAR^{CD4+} para proporcionar la progenie de células T CD4+ que comprenden un CAR^{CD4+}.

[0138] En un ejemplo, el procedimiento comprende además la expansión de la célula T CD4+ polarizada por Th17 para proporcionar la progenie de célula T CD4+ polarizadas por Th17. En un ejemplo, el procedimiento comprende además la expansión de la célula T CD4+ polarizada por Th17 que comprende un CAR^{CD4+} para proporcionar la progenie de células T CD4+ polarizadas por Th17 que comprenden un CAR^{CD4+}.

[0139] En un ejemplo, el procedimiento comprende además la expansión de la célula T CD8+ para proporcionar la progenia de células T CD8+. En un ejemplo, el procedimiento comprende además la expansión de la célula T CD8+ que comprende un CAR^{CD8+} para proporcionar la progenia de células T CD8+ que comprenden un CAR^{CD8+}.

[0140] En un ejemplo, los procedimiento comprende además proporcionar una segunda célula T CD8+ que comprende un segundo CAR^{CD8+}, por ejemplo, mediante la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR^{CD8+} en una célula T CD8+;
en el que,
el segunda CAR^{CD8+} comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular,
en el que el segundo CAR^{CD8+} difiere del CAR^{CD4+}.

[0141] En un ejemplo, el segundo CAR^{CD8+} no comprende un dominio de señalización ICOS y comprende un dominio de señalización intracelular no presente en el CAR^{CD8+}.

[0142] En un ejemplo, el procedimiento comprende además
f) proporcionar una segunda célula T CD8+;
g) introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo CAR^{CD8+} en la célula T CD8+ para proporcionar una célula T CD8+ que comprende un CAR^{CD8+}. En un ejemplo, f) se realiza antes de a).

[0143] En un ejemplo, f) comprende la selección de una segunda célula T CD8+, por ejemplo, mediante selección negativa o por clasificación de células.

[0144] En un ejemplo, el procedimiento comprende además la expansión de la segunda célula T CD8+ para proporcionar la progenie de segundas células T CD8+. En un ejemplo, el procedimiento comprende además la expansión de la segunda célula T CD8+ que comprende un CAR^{CD8+} para proporcionar la progenie de segundas células T CD8+ que comprenden un segundo CAR^{CD8+}.

[0145] En algunos casos, el procedimiento de fabricación descrito en el presente documento comprende además poner en contacto la población de células CD4+, células CD8+, o células CD4+ y CD8+, con un ácido nucleico que codifica una subunidad de la telomerasa, por ejemplo, hTERT. El ácido nucleico que codifica la subunidad de telomerasa puede ser ADN.

[0146] En algunos casos, el procedimiento de fabricación descrito en el presente documento comprende además el cultivo de la población de las células CD4+, células CD8+ o células CD4+ y CD8+, en suero que comprende suero al 2% de hab.

[0147] Los encabezamientos, subencabezamientos o elementos numerados o con letras, por ejemplo, (a), (b), (i), etc, se presentan meramente para facilitar la lectura. El uso de encabezamientos o elementos numerados o con letras en el presente documento no requiere que las etapas o elementos se realicen en orden alfabético o que las etapas o elementos sean necesariamente discretos uno del otro.

[0148] Otras características, objetos, y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

[0149] Ciertos ejemplos de la presente descripción proporcionan realizaciones de la presente invención. Más particularmente, la presente invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0150] Las figuras 1A y 1B son representaciones esquemáticas de CAR basados en ICOS. La Figura 1A muestra un panel de receptores quiméricos que contienen el fragmento de cadena única SS1 que se une a la mesotelina y

difieren en el dominio intracelular. La Figura 1B muestra un panel de receptores quiméricos que contienen el fragmento de cadena única Mov19 que se une a Receptor-α de folato y difieren en el dominio intracelular.

Las Figuras 2A y 2B muestran la eliminación de células tumorales por células T CD4+ y CD8+ redirigidas con SS1-CAR. Las células T CD4+ (Fig. 2A) y CD8+ (Fig. 2B) se cocultivaron con células diana L55 que expresan luciferasa de luciérnaga (fLuc) durante 18 horas a las relaciones efector-diana indicadas (E:T). La citolisis específica se determinó usando un ensayo de bioluminiscencia.

Las Figuras 3A, 3B, 3C, 3D y 3E muestran la liberación de citocinas por células T CD4 y CD8+ redirigidas después del reconocimiento de antígenos en células tumorales. Las células T CD4+ (Figs. 3A, 3B, y 3C) o células T CD8+ (Fig. 3D y 3E) (4 x 10^5, 60% positivo de receptor quiméricor) se cocultivaron con 2 x 10^5 células tumorales en los medios de cultivo. Los sobrenadantes se obtuvieron 24 horas después de cocultivo, y se analizaron TNF-α, IL-2 e IFN-γ por ELISA. Las barras de error indican la desviación estándar (SD) en muestras duplicadas.

Las Figuras 4A, 4B y 4C muestran que el dominio intracelular ICOS mejoró la persistencia in vivo de células T CD4+ que expresan CAR, un efecto que es independiente del dominio intracelular CAR utilizado para redirigir células T CD8+. Se trataron ratones NSG portadores de tumores de células de pulmón no pequeñas subcutáneas (L55) 30 días después de la implantación del tumor con dos dosis de células T CD4+ y CD8+ redirigidas con SS1-CARS. La concentración de células T CD4+ se determinó en la sangre de animales tratados 22 días después de la inyección de células T. Las barras de error representan SEM (n = 7-10). La Figura 4A muestra que las células T CD4+ y CD8+ se redirigieron con la misma construcción (z, 28Z, BBz o ICOSz). La Figura 4B muestra que las células T CD8+ se redirigieron con SS1-BBz y las células T CD4+ se dejaron sin transducir (UTD-BBz) o se redirigieron con 28z (28Z-BBz), BBz (BBz-BBz) o ICOSz (ICOSz-BBz). La Figura 4C muestra que las células T CD4+ se redirigieron con ICOSz y las célula T CD8+ fueron redirigidas con 28z, BBz o ICOSz.

Las Figuras 5A, 5B y 5C muestran que células T CD4+ que expresan un CAR basado en ICOS aumentaron significativamente la persistencia de célula T CD8+ que expresan SS1-CAR basados en CD28 o 4-1BB. Se trataron ratones NSG portadores de tumores de células de pulmón no pequeñas subcutáneas (L55) 30 días después de la implantación del tumor con dos dosis de células T CD4+ y CD8+ redirigidas con SS1-CARS. La concentración de células T CD8+ se determinó en la sangre de animales tratados 22 días después de la inyección de células T. Las barras de error representan SEM (n = 7-10). La Figura 4A muestra que las células T CD4+ y CD8+ se redirigieron con la misma construcción (z, 28Z, BBz o ICOSz). La Figura 4B muestra que las células T CD8+ se redirigieron con SS1-BBz y las células T CD4+ se dejaron sin transducir (UTD-BBz) o se redirigieron con 28z (28Z-BBz), BBz (BBz-BBz) o ICOSz (ICOSz-BBz). En la Figura 5C, las células T CD8+ fueron redirigidas con 28z y las células T CD4+ fueron redirigidas con 28z o ICOSz.

Las figuras 6A y 6B muestran que las células T CD4+ polarizadas por T_H17 que expresan un CAR basado en ICOS aumentaron significativamente la persistencia circulatoria de células T CD8+ en masa que expresan CAR basados en 4-1BB. Se trataron ratones NSG portadores de tumores de células de pulmón no pequeñas subcutáneas (L55) 30 días después de la implantación del tumor con dos dosis de células T CD4+ y CD8+ redirigidas con SS1-CARS. Las células T CD8+ fueron redirigidas con Bbz y las células T CD4+ se dejaron sin transducir o se redirigieron con ICOSz. Las células T CD4+ redirigidas con ICOSz se cultivaron con o sin condiciones polarizantes por T_H17. La concentración de células T CD4+ (Fig. 6A) y células T CD8+ (Fig. 6B) se determinó en la sangre de los animales tratados 22 días después de la inyección de células T. Las barras de error representan SEM (n = 7-10).

La Figura 7 muestra el efecto antitumoral y la persistencia de células T CD4+ y CD8+ redirigidas con SS1-CARS en ratones con tumores de pulmón de células no pequeñas. Se trataron ratones NSG portadores de tumores de ovario subcutáneo (L55) 15 días después de la implantación del tumor con dos dosis de células T CD4+ y CD8+ redirigidas con SS1-CARS. Las células T CD8+ fueron redirigidas con 28z y las células T CD4+ se dejaron sin transducir o se redirigieron con 28z, BBz o ICOSz. La Figura 7 representa el volumen del tumor 13 días después de la inyección de células T. Los resultados se expresan como volumen tumoral medio (+/- SE) con n = 7-8 ratones por grupo.

La Figura 8 muestra la infiltración de células T CD4+ en tumores tratados con células T redirigidas. Se trataron ratones NSG portadores de tumores de células de pulmón no pequeñas subcutáneas (L55) 15 días después de la implantación del tumor con dos dosis de células T CD4+ y CD8+ redirigidas con SS1-CARS. Las células T CD8+ fueron redirigidas con Bbz y las células T CD4+ se dejaron sin transducir o se redirigieron con 28z, BBz o ICOSz. Las células T CD4+ redirigidas con ICOSz se cultivaron con o sin condiciones polarizantes por T_H17. El infiltrado inmune se evaluó mediante inmunohistoquímica para células T CD4+ humanas en el día 27 después del tratamiento. El porcentaje de núcleos que se tiñeron positivos para células T CD4+ en las zonas intactas de tumor se cuantificó con el software Aperio ImageScope. Los diagramas de cajas muestran la mediana (línea) y el 25o-75o percentil (cuadro). El final de los bigotes representa el mínimo y el máximo de todos los datos. * P> 0,05 frente a todos los grupos, ** p> 0,05 frente UTD-28z y 28z-BBz.

Las figuras 9A, 9B y 9C muestran el efecto antitumoral y la persistencia de células T de células T CD4+ y CD8+ redirigidas con Mov19-CAR en ratones con tumores de ovario. Se trataron ratones NSG portadores de tumores de ovario subcutáneos (SKOV3) 30 días después de la implantación del tumor con dos dosis de células T CD4+ y CD8+ redirigidas con Mov19-CARS. Las células T CD8+ fueron redirigidas con Bbz y las células T CD4+ se dejaron sin transducir o se redirigieron con z, 28z, BBz o ICOSz. La Figura 8A representa el volumen tumoral analizado en los puntos de tiempo indicados. Los resultados se expresan como volumen tumoral medio (+/- SE) con n = 6-8 ratones por grupo. La concentración de células T CD4+ (Fig. 9B) y CD8+ (Fig. 9C) se determinó en la sangre de animales tratados 27 días después de la inyección de células T. Las barras de error representan SEM (n = 6-8).

Las Figuras 10A, 10B, 10C, y 10D muestran la terapia de combinación usando células T CD4+ redirigidas con un CAR basado en ICOS y células T CD8+ redirigidas con CAR 28z y Bbz. Se trataron ratones NSG portadores de tumores subcutáneos de ovario (SKOV3), páncreas (Capan-2) o pulmón (L55) 15 días después de la implantación

del tumor con dos dosis de células T CD4+ y CD8+ redirigidas con SS1-CARS. Las células T CD4+ fueron redirigidas con ICOSz y las células T CD8+ fueron redirigidas con una mezcla de CAR 28z y Bbz. El volumen del tumor se analizó en los puntos de tiempo indicados para el modelo de tumor de ovario (SKOV3) (Fig. 10A), el modelo de tumor de páncreas (Capan-2) (Fig. 10B), y el tumor de pulmón (L55) (Fig. 10C). Los resultados se expresan como volumen tumoral medio (+/- SE) con n = 5 ratones por grupo. Los círculos blancos indican la población de control y los cuadrados negros indican la población tratada. En la Figura 10D, las concentraciones de células T CD4+ (barras blancas) y CD8+ (barras rayadas) se determinaron en la sangre de animales tratados 33 días después de la inyección de células T. Las barras de error representan SEM (n = 5).

Las Figuras 11A, 11B, 11C y 11D muestran el efecto antitumoral y la persistencia de células T de células T CD4+ redirigidas con un CAR mutante de ICOS en ratones con tumores de páncreas. La Figura 11A muestra las secuencias de aminoácidos del dominio intracelular de ICOS utilizado en receptores de antígenos quiméricos. Las mutaciones FMFM (SEQ ID NO: 47) están subrayadas y se indica la interacción de señalización con PI3K. Se trataron ratones NSG portadores de tumores pancreáticos subcutáneos (Capan-2) 15 días después de la implantación del tumor con dos dosis de células T CD4+ y CD8+ redirigidas con SS1-CAR. Las células T CD8+ fueron redirigidas con Bbz y las células T CD4+ fueron redirigidas con delz, BBz, ICOSz o ICOS(FMFM)z (figura 11B). ("FMFM" se da a conocer como SEQ ID NO: 47). El volumen del tumor se analizó en los puntos de tiempo indicados. Los resultados se expresan como volumen tumoral medio (+/- SE) con n = 6-8 ratones por grupo. La concentración de células T CD4+ (Fig. 11C) y CD8+ (Fig. 12D) se determinó en la sangre de animales tratados 21 días después de la inyección de células T. Las barras de error representan SEM (n = 6-8).

La Figura 12 muestra que la proliferación de células T transducidas que expresan CAR aumenta mediante dosis bajas de RAD001 en un sistema de cultivo celular. Las CARTS se cocultivaron con células NALM6 (Nalm-6) en presencia de diferentes concentraciones de RAD001 (nM). El número de células T CAR-positivas CD3-positivas (negro) y las células T totales (blanco) se evaluó después de 4 días de cocultivo.

La Figura 13 representa mediciones de crecimiento tumoral de células NALM6-luc con dosificación diaria de RAD001 a 0,3, 1, 3, y 10 mg/kg (mpk) o dosificación de vehículo. Los círculos indican el vehículo; los cuadrados indican la dosis de 10 mg/kg de RAD001; los triángulos indican la dosis de 3 mg/kg de RAD001, los triángulos invertidos indican la dosis de 1 mg/kg de RAD001; y los diamantes indican la dosis de 0,3 mg/kg de RAD001.

Las Figuras 14A y 14B muestran las curvas farmacocinéticas que muestran la cantidad de RAD001 en la sangre de ratones NSG con tumores NALM6. La fig. 14A muestra le día 0 de PK después de la primera dosis de RAD001. La fig. 14B muestra el día 14 de PK después de la dosis final de RAD001. Los diamantes indican la dosis de 10 mg/kg de RAD001; los cuadrados indican una dosis de 1 mg/kg de RAD001; los triángulos indican la dosis de 3 mg/kg de RAD001; y las x indican la dosis de 10 mg/kg de RAD001.

Las Figuras 15A y 15B muestran la proliferación in vivo de células de CART CD19 humanizadas con y sin dosificación con RAD001. Las dosis bajas de RAD001 (0,003 mg/kg) diaria conducen a una mejora en la proliferación de células T CAR, por encima del nivel normal de la proliferación de huCAR19. La Figura 15A muestra células T CAR CD4+; la fig. 15B muestra células T CAR CD8+. Los Círculos indican PBS; los cuadrados indican huCTL019; los triángulos indican huCTL019 con 3 mg/kg de RAD001; los triángulos invertidos indican huCTL019 con 0,3 mg/kg de RAD001; los diamantes indican huCTL019 con 0,03 mg/kg de RAD001; y los círculos indican huCTL019 con 0,003 mg/kg de RAD001.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

DEFINICIONES

[0151] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece la invención.

[0152] "Un" y "una", tal como se usa el término en el presente documento, se refiere a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

[0153] "Aproximadamente", tal como se usa el término en el presente documento, cuando se hace referencia a un valor medible, tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, se entiende que comprende variaciones de ± 20% o en algunas realizaciones ± 10%, o en algunas realizaciones ± 5%, o en algunas realizaciones ± 1%, o en algunas realizaciones ± 0,1% del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para llevar a cabo los procedimientos descritos.

[0154] La frase "a punto de recibir", cuando se usa en el presente documento en el contexto de un paciente que recibe un primer agente terapéutico que está a punto de recibir un segundo agente terapéutico, se refiere a una situación en la que el paciente está recibiendo o ha recibido el primer agente terapéutico para una trastorno (por ejemplo, un cáncer), en el que el paciente recibe o va a recibir el segundo agente terapéutico en el transcurso del tratamiento para ese trastorno.

[0155] Un "dominio de unión a antígeno", tal como se usa el término en el presente documento, se refiere a una molécula que tiene afinidad por un antígeno diana, típicamente un antígeno en una célula diana, por ejemplo, una

célula de cáncer. Un dominio de unión a antígeno de ejemplo comprende un polipéptido, por ejemplo, una molécula de anticuerpo (que incluye un anticuerpo y los fragmentos de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, una inmunoglobulina, anticuerpo de dominio único (sdAb, por ejemplo, un nanocuerpo y un scFv), o un andamio que no es anticuerpo, por ejemplo, una fibronectina, y similares. En realizaciones, el dominio de unión a antígeno es un polipéptido único. En realizaciones, el dominio de unión a antígeno comprende uno, dos, o más polipéptidos. En realizaciones, el dominio de unión a antígeno comprende un fragmento de un anticuerpo que es suficiente para conferir reconocimiento y unión específica al antígeno diana. Los ejemplos de un fragmento de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, un fragmento Fab, Fab', $F(ab')_2$ o Fv, un fragmento de anticuerpo scFv, un anticuerpo lineal, un anticuerpo de dominio único, tal como un sdAb, por ejemplo, un nanocuerpo, (ya sea VL o VH), un dominio VHH de camélidos, y los anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. En una realización, el dominio de unión a antígeno es un "scFv", que puede comprender una proteína de fusión que comprende una cadena VL y una cadena VH de un anticuerpo, en el que VH y VL están unidos a través de un enlazador de polipéptido flexible corto. El scFv es capaz de ser expresado como un polipéptido de cadena única y retiene la especificidad del anticuerpo intacto del que deriva. Además, las cadenas variables VL y VH se pueden enlazar en cualquier orden, por ejemplo, con respecto a los extremos N-terminales y C-terminales del polipéptido, el scFv puede comprender VL-enlazador-VH o puede comprender VH-enlazador-VL. En realizaciones, el dominio de unión a antígeno comprende un andamio que no es anticuerpo, por ejemplo, una fibronectina, anquirina, anticuerpo de dominio, por ejemplo, un nanocuerpo, lipocalina, compuesto inmunofarmacéutico modular pequeño, maxicuerpo, Proteína A o afilina. El andamio que no es anticuerpo tiene la capacidad de unirse a antígeno diana en una célula. En realizaciones, el dominio de unión a antígeno es un polipéptido o fragmento del mismo de una proteína de origen natural que se expresa en una célula. En una realización, el dominio de unión a antígeno se une a un factor de crecimiento o receptor de hormona. Si bien no se desea estar ligado por la teoría, el dominio de unión a antígeno sirve para proporcionar especificidad para las células diana, y en las realizaciones, optimizar e inmunizar la función efectora mediante el acoplamiento de la unión del antígeno a la generación de una señal por un dominio de señalización intracelular en un miembro de señalización intracelular. Los dominios extracelulares que se unen a un contraligando, por ejemplo, en las células diana, también están dentro de la definición de dominio de unión a antígeno.

[0156] Tal como se usa en el presente documento, el término "molécula de anticuerpo" se refiere a una proteína, por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina o fragmento de la misma, que comprende al menos una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. En una realización, una molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, comprende una pluralidad de secuencias de dominio variable de inmunoglobulina, en donde una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión para un primer epítopo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión para un segundo epítopo. En una realización, una molécula de anticuerpo multiespecífico es una molécula de anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico tiene especificidad por no más de dos antígenos. Una molécula de anticuerpo biespecífico se caracteriza por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión por un primer epítopo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión por un segundo epítopo.

[0157] El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente con un antígeno diana. Un anticuerpo puede ser inmunoglobulina intacta derivada de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y puede ser una porción inmunorreactiva de inmunoglobulina intacta. Los anticuerpos son típicamente tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. La molécula de anticuerpo descrita en el presente documento pueden existir en una variedad de formas en que la parte del anticuerpo de unión a antígeno se expresa como parte de una cadena polipeptídica contigua que incluye, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de dominio único (sdAb), un anticuerpo de cadena única (scFv) y un anticuerpo humanizado o humano, por ejemplo, como se describe en el presente documento.

[0158] El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto, y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo de dominio de cadena única (sdAb), Fab, Fab', F(ab')2, fragmentos Fv, Fv unidos a disulfuro (sdFv), un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, anticuerpos lineales, anticuerpos scFv, un anticuerpo lineal, un anticuerpo de dominio único, tal como un sdAb (ya sea VL o VH), un dominio VHH de camélidos, moléculas multiespecíficas formadas a partir de fragmentos de anticuerpos, tales como un fragmento bivalente que comprende dos o más, por ejemplo, dos, fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra, o dos o más, por ejemplo, dos CDR aisladas u otros fragmentos de unión a epítopo de un anticuerpo enlazado. Un fragmento de anticuerpo también puede ser incorporado en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, nanocuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, Nature Biotechnology 23: 1126-1136, 2005). Los fragmentos de anticuerpos también pueden ser injertados en andamios basados en polipéptidos, tales como fibronectina de tipo III (Fn3) (véase la Patente de Estados Unidos No.: 6.703.199, que describe minicuerpos de polipéptido de fibronectina).

[0159] Una "cadena pesada de anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la mayor de los dos tipos de cadenas de polipéptido presentes en todas las moléculas de anticuerpos en sus conformaciones naturales.

[**0160]** Una "cadena ligera de anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la más pequeña de los dos tipos de cadenas de polipéptido presentes en todas las moléculas de anticuerpos en sus conformaciones naturales. Las cadenas ligeras κ y λ se refieren a los dos principales isotipos de cadena ligera de anticuerpo.

[0161] Por el término "anticuerpo sintético", tal como se usa en el presente documento, se entiende una molécula de anticuerpo que se genera usando tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, una molécula de anticuerpo expresada por un bacteriófago, tal como se describe en el presente documento. El término también debe interpretarse en el sentido de una molécula de anticuerpo que se ha generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica la molécula de anticuerpo y cuya molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en el que el ADN o la secuencia de aminoácidos se han obtenido utilizando tecnología de ADN sintético o secuencia de aminoácidos que está disponible y es bien conocida en la técnica.

[0162] El término "aféresis", tal como se usa en el presente documento, se refiere al proceso extracorpóreo reconocido en la técnica por el que se extrae la sangre de un donante o paciente del donante o paciente y se pasa a través de un aparato que separa un constituyente o constituyentes particulares seleccionados y devuelve el resto a la circulación del donante o paciente, por ejemplo, mediante retransfusión. Por lo tanto, "una muestra de aféresis" se refiere a una muestra obtenida usando aféresis.

[0163] "Efecto antitumoral", tal como se usa el término en el presente documento, se refiere a un efecto biológico que se puede manifestar por diversos medios, incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, una disminución en el volumen del tumor, una disminución en el número de células tumorales, una disminución en el número de metástasis, un aumento en la esperanza de vida, disminución en la proliferación de células tumorales, disminución de la supervivencia de células tumorales, o mejora de varios síntomas fisiológicos asociados con la afección cancerosa. Un "efecto antitumoral" también se puede manifestar por la capacidad de los péptidos, polinucleótidos, células y anticuerpos de la descripción en prevención de la aparición del tumor en el primer lugar.

[0164] "Autólogo", tal como se usa el término en el presente documento, se refiere a cualquier material derivado de la misma persona a la que más tarde es reintroducido.

[0165] "Alogénico", tal como se usa el término en el presente documento, se refiere a cualquier material derivado de un animal diferente de la misma especie que el individuo al que se introduce el material. Dos o más individuos se dice que son alogénicos el uno al otro cuando los genes en uno o más loci no son idénticos. En algunos aspectos, el material alogénico de individuos de la misma especie puede ser suficientemente genéticamente diferente para interactuar antigénicamente.

[0166] "Cáncer", tal como se usa el término en el presente documento, se refiere a una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido e incontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden diseminarse localmente o a través de la sangre y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Ejemplos de diversos tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares. En una realización, un cáncer se caracteriza por la expresión de un ligando de PD-1, por ejemplo, PD-L1 o PD-L2, en una célula de cáncer o en un microambiente tumoral. El término "cáncer" incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos malignamente transformados, independientemente del tipo histopatológico o la etapa de invasividad. Los términos "tumor" y "cáncer" se usan indistintamente en el presente documento, por ejemplo, ambos términos abarcan tumores sólidos y líquidos, por ejemplo, difusos o circulantes. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cáncer" o "tumor" incluye cánceres y tumores premalignos, así como malignos.

[0167] Los términos "antígeno asociado a cáncer" o "antígeno tumoral" o "antígeno de trastorno proliferativo" o "antígeno asociado con un trastorno proliferativo" se refieren indistintamente a una molécula (típicamente proteína, carbohidrato o lípido) que se expresa preferentemente en la superficie de una célula de cáncer, ya sea totalmente o como un fragmento (por ejemplo, MHC/péptido), en comparación con una célula normal, y que es útil para el direccionamiento preferencial de un agente farmacológico a la célula cancerosa. En algunas realizaciones, el antígeno tumoral es un antígeno que es común a un trastorno proliferativo específico. En algunas realizaciones, un antígeno asociado al cáncer es una molécula de superficie celular que se sobreexpresa en una célula de cáncer en comparación con una célula normal, por ejemplo, sobreexpresión de 1 vez, sobreexpresión de 2 veces, sobreexpresión de 3 veces o más en comparación con una célula normal. En algunas realizaciones, un antígeno asociado al cáncer es una molécula de superficie celular que se sintetiza de forma inapropiada en la célula cancerosa, por ejemplo, una molécula que contiene deleciones, adiciones o mutaciones en comparación con la molécula expresada en una célula normal. En algunas realizaciones, un antígeno asociado al cáncer se expresará exclusivamente en la superficie celular de una célula cancerosa, por completo o como un fragmento (por ejemplo, MHC/péptido), y no se sintetiza o se expresa en la superficie de una célula normal. En algunos casos, los CAR de la presente descripción incluyen CAR que comprenden un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que se une a un péptido presentado por MHC. Normalmente, los péptidos derivados de

proteínas endógenas llenan los bolsillos de moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I, y son reconocidos por receptores de células T (TCR) en linfocitos T CD8+. Los complejos MHC de clase I se expresan de forma constitutiva por todas las células nucleadas. En el cáncer, los complejos péptido/MHC específicos de virus y/o específicos de péptido representan una clase única de dianas de superficie celular para la inmunoterapia. Se han descrito anticuerpos similares a TCR que reconocen péptidos derivados de antígenos virales o tumorales en el contexto de antígeno leucocitario humano (HLA)-A1 o HLA-A2 (véase, por ejemplo, Sastry et al, J Virol 2011 85 (5): 1935-1942; Sergeeva et al, Bood, 2011 117 (16): 4.262-4.272; Verma et al, J Immunol 2010 184 (4): 2156-2165; Willemsen et al, Gene Ther 2001 8 (21): 1601-1608; Dao et al, Sci Transl Med 2013 5 (176): 176ra33; Tassev et al, Cancer gene Ther 2012 19 (2): 84-100). Por ejemplo, el anticuerpo similar a TCR puede ser identificado a partir de cribado de una biblioteca, tal como una biblioteca expresada en fago de scFv humano. En consecuencia, la presente descripción proporciona CAR que comprenden un dominio de unión a antígeno que se une a un péptido presentado por MHC de una molécula seleccionada del grupo de WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1 y RAGE-1.

[0168] "Receptor de antígeno quimérico" o, alternativamente, un "CAR", tal como se utiliza el término en el presente documento, se refiere a una construcción de polipéptido recombinante que comprende al menos un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización citoplásmico (también denominado en el presente documento "un dominio de señalización intracelular") que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora y/o molécula coestimuladora, tal como se define a continuación. En algunas realizaciones, los dominios en la construcción de polipéptido CAR están en la misma cadena polipeptídica, por ejemplo, comprenden una proteína de fusión quimérica. En otras realizaciones, los dominios en la construcción de polipéptido CAR no son contiguos entre sí, por ejemplo, están en diferentes cadenas de polipéptido, por ejemplo, tal como se proporciona en un RCAR, tal como se describe en el presente documento.

[0169] En un aspecto, la molécula estimuladora del CAR es la cadena zeta asociada con el complejo de receptor de células T (por ejemplo, CD3 zeta). En un aspecto, el dominio de señalización citoplásmico comprende un dominio de señalización primaria (por ejemplo, un dominio de señalización primaria de CD3-zeta). En un aspecto, el dominio de señalización citoplásmico comprende además uno o más dominios de señalización funcionales derivados de al menos una molécula coestimuladora, tal como se define a continuación. En un aspecto, la molécula coestimuladora se elige de 4-1BB (es decir, CD137), CD27, CD28 y/o ICOS. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula coestimuladora y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende dos dominios de señalización funcionales derivados de una o más moléculas coestimuladoras y un dominio de señalización funcional derivados de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende al menos dos dominios de señalización funcionales derivados de una o más moléculas coestimuladoras y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto el CAR comprende una secuencia líder opcional en el extremo amino terminal (N-ter) de la proteína de fusión CAR. En un aspecto, el CAR comprende, además, una secuencia líder en el extremo N-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular, en el que la secuencia líder se escinde opcionalmente del dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un scFv) durante el procesamiento celular y la localización del CAR a la membrana celular.

[0170] La porción del CAR de la descripción que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo puede existir en una variedad de formas, por ejemplo, donde el dominio de unión a antígeno se expresa como parte de una cadena de polipéptido que incluye, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de dominio único (sdAb), un anticuerpo de cadena única (scFv), o, por ejemplo, un anticuerpo humanizado o anticuerpo biespecífico (Harlow et al, 1999, en: Using antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow. et al, 1989, en: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston et al, 1988, Proc Natl Acad Sci USA. 85: 5879-5883; Bird et al, 1988, Science 242: 423-426). En un aspecto, el dominio de unión a antígeno de una composición de CAR de la invención comprende un fragmento de anticuerpo. En un aspecto adicional, el CAR comprende un fragmento de anticuerpo que comprende un scFv.

[0171] Un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un scFv, un anticuerpo de dominio único, o TCR (por ejemplo, un dominio de unión a TCR alfa o dominio de unión a TCR beta)) que reconoce un antígeno asociado a cáncer específico (o marcador tumoral) X, tales como los descritos en el presente documento, también se refiere como XCAR. Por ejemplo, un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno que reconoce CD19 se conoce como CD19CAR.

[0172] "Célula CARX", tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a una célula que comprende CAR. Cualquier célula que está diseñada para expresar un CAR se puede utilizar como una célula CARX. Típicamente, la célula CARX es una célula T que comprende un CAR, y se conoce como una célula

CART. En un ejemplo, CART es una célula T CD4+ que comprende un CAR, y se denomina en el presente documento como célula T CD4+ que comprende un CAR^{CD4+}. En un ejemplo, CART es una célula T CD8+ que comprende un CAR, y se denomina en el presente documento como una célula T CD8+ que comprende un CAR^{CD8+}. En una realización la célula CART es autóloga para el paciente. En una realización CART es alogénica para el paciente. En un ejemplo, un paciente recibe más de un tipo de célula CART, por ejemplo, el paciente recibe una célula T CD4+ que comprende un CAR^{CD4+} y una célula CD8+ T que comprende un CAR^{CD8+}.

[0173] "CAR $^{CD4+}$" y "CAR $^{CD8+}$" tal como se utilizan estos términos en el presente documento, se refieren a un CAR asociado con, respectivamente, una célula T CD4+ y una célula T CD8 +. En una realización, el CAR^{CD4+} se proporciona en, se diseña para optimizar el rendimiento de, u optimiza el rendimiento de, una célula T CD4+. En una realización, el CAR^{CD8+} se proporciona en, se diseña para optimizar el rendimiento de, u optimiza el rendimiento de, una célula T CD8+. Típicamente, un CAR^{CD4+} optimiza el rendimiento de una célula T CD4+ y, en casos, comprende un dominio ICOS. Típicamente, un CAR^{CD8+} optimiza el rendimiento de una célula T CD8+ y, en realizaciones, comprende un dominio CD28 o 4-1BB. Por lo tanto, los CAR pueden ser optimizados para un subconjunto seleccionado de células T, por ejemplo, célula T CD4+ o célula T CD8+.

[0174] Un célula T CD4+ que comprende un CAR^{CD4+} y una célula T CD8+ que comprende un CAR^{CD8+}, por ejemplo, cuando se proporciona en un kit, la composición, o se administran a un paciente, difieren una de otra en la estructura. El CAR^{CD4+} y el CAR^{CD8+} pueden diferir uno de otro, por ejemplo, en el que el dominio de señalización intracelular del CAR^{CD4+} se diferencia del dominio de señalización intracelular del CAR^{CD8+}, en el que el CAR^{CD4+} comprende un primer dominio coestimulador no presente en el CAR^{CD8+}, en el que el CAR^{CD4+} comprende un primer dominio coestimulador y el CAR^{CD8+} comprende un segundo dominio coestimuladoro, o en el que el CAR^{CD4+} comprende un primer dominio coestimulador, por ejemplo, un dominio ICOS, no presente en el CAR^{CD8+} y el CAR^{CD8+} comprende un segundo dominio coestimulador, por ejemplo, un dominio CD28 o 4-1BB, no presente en el CAR^{CD4+}.

[0175] Una célula T CD4+, tal como ese término se usa en el presente documento, se refiere a una célula T que expresa la proteína de superficie CD4. En una realización, la célula T expresa la proteína de superficie CD4 a un nivel suficiente para ser detectada, por ejemplo, mediante citometría de flujo.

[0176] Una célula T CD8+, tal como ese término se usa en el presente documento, se refiere a una célula T que expresa la proteína de superficie CD8. En una realización, la célula T expresa la proteína de superficie CD8 a un nivel suficiente para ser detectada, por ejemplo, mediante citometría de flujo.

[0177] Los términos "región determinante de complementariedad" o "CDR", tal como se usan en el presente documento, se refieren a las secuencias de aminoácidos dentro de las regiones variables de anticuerpos que confieren especificidad de antígeno y afinidad de unión. Por ejemplo, en general, hay tres CDR de cada región variable de cadena pesada (por ejemplo, HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y tres CDR de cada región variable de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3). Los límites precisos de las secuencias de aminoácidos de una determinada CDR pueden determinarse usando cualquiera de un número de esquemas bien conocidos, incluyendo los descritos por Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest"", 5ª ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD (esquema de numeración “Kabat”), Al-Lazikani et al.., (1997) JMB 273,927-948 (esquema de numeración “Chothia"), o una combinación de los mismos. Bajo el esquema de numeración de Kabat, en algunas realizaciones, los residuos de aminoácidos de CDR en el dominio variable de cadena pesada (VH) están numerados como 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos de CDR en el dominio variable de cadena ligera (VL) se numeran como 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), y 89-97 (LCDR3). Bajo el esquema de numeración de Chothia, en algunas realizaciones, los aminoácidos de CDR de VH se numeran como 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos de CDR de VL se numeran como 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2), y 91-96 (LCDR3). En un esquema de numeración de Kabat y Chothia combinado, en algunas realizaciones, las CDR corresponden a los residuos de aminoácidos que son parte de una CDR de Kabat, una CDR de Chothia, o ambos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las CDR corresponden a residuos de aminoácidos 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3) en una VH, por ejemplo, una VH de mamífero, por ejemplo, una VH de ser humano; y residuos de aminoácidos 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), y 89-97 (LCDR3) en una VL, por ejemplo, una de VL mamífero, por ejemplo, una VL de ser humano.

[0178] "Dominio coestimulador de señalización", tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a un dominio intracelular de señalización de una molécula, por ejemplo, una molécula endógena, de la célula CART que, tras la unión a su contraligando afín en una célula diana, mejora, por ejemplo, aumenta, una respuesta efectora inmunitaria. Un dominio coestimulador de señalización intracelular puede ser la porción intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero no se limitan a, una molécula de MHC de clase I, proteínas del receptor de TNF, proteínas similares a una inmunoglobulina, receptores de citocinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores de células NK activadoras, BTLA, un receptor de ligando Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 41BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1,

ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS , SLP-76, PAG/CBP, CD19a, y un ligando que se une específicamente con CD83. "Molécula coestimulante" se refiere a una molécula que comprende un "dominio coestimulador de señalización." Un dominio coestimulador de señalización intracelular puede derivar de la porción intracelular de una molécula coestimuladora. El dominio de señalización intracelular puede comprender la parte intracelular completa, o el dominio de señalización intracelular nativ completo, de la molécula de la que se deriva, o un fragmento funcional de la misma.

[0179] Tal como se usa en el presente documento, el término "CD19" se refiere a la proteína Cluster de Diferenciación 19, que es un determinante antigénico detectable en las células precursoras de leucemia. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos humanas y murino se pueden encontrar en una base de datos pública, tal como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de CD19 humano se puede encontrar como UniProt/Swiss-Prot Nº de acceso P15391 y la secuencia de nucleótidos que codifica la CD19 humana se puede encontrar en el Nº de Acceso NM_001178098. Tal como se usa en el presente documento, "CD19" incluye proteínas que comprenden mutaciones, por ejemplo, mutaciones puntuales, fragmentos, inserciones, deleciones y variantes de empalme de CD19 de tipo salvaje de longitud completa. CD19 se expresa en la mayoría de los cánceres de linaje B, incluyendo, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda, leucemia de linfocitos crónica y linfoma no Hodgkin. Otras células que expresan CD19 se proporcionan a continuación en la definición de "enfermedad asociada con la expresión de CD19." También es un marcador precoz de progenitores de células B. Véase, por ejemplo, Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-65 (1997). En un aspecto, la porción de unión a antígeno de CART reconoce y se une a un antígeno en el dominio extracelular de la proteína CD19. En un aspecto, la proteína CD19 se expresa en una célula de cáncer.

[0180] "Derivado de" tal como ese término se usa en el presente documento, indica una relación entre una primera y una segunda molécula. Se refiere en general a la similitud estructural entre la primera molécula y una segunda molécula y no conota o incluye un proceso o limitación de fuente en una primera molécula que se deriva de una segunda molécula. Por ejemplo, en el ejemplo de un dominio de señalización intracelular que se deriva de una molécula CD3zeta, el dominio de señalización intracelular retiene suficiente estructura de CD3zeta, de tal manera que tiene la función requerida, a saber, la capacidad de generar una señal en las condiciones apropiadas. No conota o incluye una limitación a un proceso particular de producir el dominio de señalización intracelular, por ejemplo, que no quiere decir que, para proporcionar el dominio de señalización intracelular, se deba comenzar con una secuencia CD3zeta y eliminar la secuencia no deseada, o imponer mutaciones, para llegar al dominio de señalización intracelular.

[0181] La frase "enfermedad asociada con la expresión de un marcador tumoral tal como se describe en el presente documento" incluye, pero no se limita a, una enfermedad asociada con una célula que expresa un marcador tumoral como se descrbe en el presente documento o afección asociada con una célula que expresa, o en cualquier tiempo ha expresado, un marcador tumoral como se describe en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, enfermedades proliferativas, tales como un cáncer o tumor maligno o una afección precancerosa, tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o un preleucemia; o una indicación relacionada no cancerosa asociada con una célula que expresa un marcador tumoral tal como se describe en el presente documento. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de un marcador tumoral tal como se describe en el presente documento es un cáncer hematológico. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de un marcador tumoral como se describe en el presente documento es un cáncer sólido. Otras enfermedades asociadas con la expresión de un marcador tumoral como se describe en el presente documento incluyen, pero no limitado a, por ejemplo, cánceres, tumores malignos, condiciones precancerosas o enfermedades proliferativas asociadas con la expresión de un marcador tumoral como se describe en el presente documento atípicos y/o no clásicos. Indicaciones no relacionadas con cáncer asociadas con la expresión de un marcador tumoral como se describe en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, enfermedad autoinmune, (por ejemplo, lupus), trastornos inflamatorios (alergia y el asma) y el trasplante.

[0182] La frase "enfermedad asociada con la expresión de CD19" incluye, pero no se limita a, una enfermedad asociada con una célula que expresa CD19 o afección asociada con una célula que expresa, o en cualquier momento ha expresado, CD19, incluyendo, por ejemplo, enfermedades proliferativas, tales como un cáncer o tumor maligno o una afección precancerosa, tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia; o una indicación relacionada no cancerosa asociada con una célula que expresa CD19. Para evitar dudas, una enfermedad asociada con la expresión de CD19 puede incluir una condición asociada con una célula que no expresa actualmente CD19, por ejemplo, porque la expresión de CD19 ha sido regulada por disminución, por ejemplo, debido al tratamiento con una molécula que reconoce CD19, por ejemplo, un CAR CD19, pero que a la vez expresa CD19. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de CD19 es un cáncer hematológico. En un aspecto, el cáncer hematológico es una leucemia o un linfoma. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de CD19 incluye cánceres y tumores malignos, incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, una o más leucemias agudas, incluyendo pero no limitado a, por ejemplo, leucemias agudas, incluyendo, pero no limitadas a, por ejemplo, leucemia linfoide aguda de células B ("BALL"), leucemia linfoide aguda de células T ("TALL"), leucemia linfoide

aguda (ALL); una o más leucemias crónicas, incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (CLL). Cánceres hematológicos o condiciones hematológicas adicionales asociados con la expresión de CD19 comprenden, pero no se limitan a, por ejemplo, leucemia prolinfocítica de células B, neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células grandes o células pequeñas, condiciones linfoproliferativas malignos, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y el síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma plasmablástico, neoplasia de células dendríticas plasmacitoides, macroglobulinemia de Waldenstrom, y "preleucemia", que son una diversa colección de condiciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides, y similares. Otras enfermedades asociadas con la expresión de CD19 incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, cánceres, tumores malignos, condiciones precancerosas o enfermedades proliferativas asociadas con la expresión de CD19 atípicos y/o no clásicos. Indicaciones no relacionadas con cáncer asociadas con la expresión de CD19 incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, enfermedad autoinmune, (por ejemplo, lupus), trastornos inflamatorios (alergia y el asma) y trasplante. En algunas realizaciones, las células que expresan el antígeno tumoral expresa, o en cualquier momento ha expresado, el ARNm que codifica el antígeno tumoral. En una realización, la céluals que expresa el antígeno tumoral produce la proteína de antígeno tumoral (por ejemplo, de tipo salvaje o mutante), y la proteína de antígeno tumoral puede estar presente a niveles normales o niveles reducidos. En una realización, la célula que expresa antígeno tumoral produjo niveles detectables de una proteína antigénica tumoral en un punto, y posteriormente no produjo sustancialmente ninguna proteína antigénica tumoral detectable.

[0183] "ARNds", tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico, que tiene al menos una región de estructura de doble cadena, que es capaz de mediar la inhibición específica de secuencia de la expresión de un gen diana. Los dsARN comprenden ARN de interferencia corto (siARN) y ARN de horquilla corto (shARN). En los ejemplos, shARN es similar en estructura a un siARN, pero incluye un resto, típicamente uno o más monómeros de ARN, que conectan una región de doble cadena de sentido y una secuencia antisentido. En un ejemplo, el shARN, después de procesamiento intracelular (por ejemplo, por Dicer), da lugar a un sARN de doble cadena de 19-23 nucleótidos con 2 nucleótidos salientes en 3'.

[0184] "Endógeno", tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a cualquier material, por ejemplo, un polipéptido, de o que se produce en un organismo, célula, tejido o sistema.

[0185] "Exógeno", tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a cualquier material, por ejemplo, un polipéptido, o molécula de dimerización, introducido desde o producidos fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

[0186] "Dominio ICOS", tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a un fragmento funcional (en términos de señalización intracelular), o análogo, de una molécula ICOS. Puede comprender toda la región intracelular, o un fragmento de la región intracelular que es suficiente para la generación de una señal intracelular, por ejemplo, cuando un dominio de unión a antígeno al que se fusiona se une a un antígeno afín. En realizaciones, el dominio ICOS tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con, o difiere en no más de 15, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 residuos de aminoácidos de los residuos correspondientes de toda la región intracelular, o un fragmento de la región intracelular que es suficiente para la generación de una señal intracelular, de una molécula ICOS de origen natural, por ejemplo, una molécula coestimuladora intracelular de un ser humano, u otro mamífero, por ejemplo, una especie no humana, por ejemplo, roedores, mono o murino. En realizaciones, el dominio coestimulador tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con, o difiere en no más de 15, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

[0187] "Célula efectora inmunitaria", tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a una célula que está implicada en una respuesta inmunitaria, por ejemplo, en la promoción de una respuesta efectora inmunitaria. Los ejemplos de células efectoras inmunitarias incluyen células T, por ejemplo, células T alfa/beta y células T gamma/delta, células B, células asesinas naturales (NK), células T asesinas naturales (NKT), mastocitos y fagocitos derivados de mieloica.

[0188] "Función efectora inmunitaria" o "respuesta efectora inmunitaria", tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a la función o la respuesta, por ejemplo, de una célula efectora inmunitaria, que mejora o promueve un ataque inmunológico de una célula diana. Por ejemplo, una función efectora o respuesta efectora inmunitaria se refiere a la propiedad de una célula T o NK que promueve la muerte o la inhibición del crecimiento o proliferación, de una célula diana. En el ejemplo de una célula T, la estimulación primaria y la coestimulación son ejemplos de la función o respuesta efectora inmunitaria. Una función o respuesta efectora inmunitaria pueden ser promovidos por la acción de un CAR, y pueden, por ejemplo, dar lugar a una célula CARX que es más eficaz en la proliferación, producción de citocinas, citotoxicidad o la regulación positiva de los marcadores de superficie celular, tales como CD25, CD69, CD107a.

[0189] Un "dominio extracelular inhibidor", tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a un

polipéptido que comprende un dominio extracelular de una molécula inhibidora. Normalmente, la unión a su contraligando tiene un efecto inhibidor sobre la generación de una respuesta efectora inmunitaria. Cuando se unen, por ejemplo, se fusionan a un dominio de señalización intracelular, redirecciona una interacción que normalmente inhibe la generación de una respuesta efectora inmunitaria en una que promueve una respuesta efectora inmunitaria.

[0190] "Molécula inhibidora", tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a una molécula, por ejemplo, una molécula endógena, de célula CARX, por ejemplo, una célula CART que, tras la unión a su contraligando afín en una célula diana, minimiza, por ejemplo, suprime o inhibe, una respuesta efectora inmunitaria. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, Gal9, adenosina y TGFR beta.

[0191] El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser la actividad citolítica o actividad auxiliar, incluyendo la secreción de citosinas.

[0192] "Dominio de señalización intracelular," tal como se usa el término en el presente documento, se refiere a una porción intracelular de una molécula. En realizaciones, el dominio de señal intracelular transduce la señal de la función efectora y dirige la célula para realizar una función especializada. Aunque se puede utilizar todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar toda la cadena. En la medida en que se utiliza una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada puede ser usada en lugar de la cadena intacta, siempre que transduzca la señal de la función efectora. El término dominio de señalización intracelular de este modo pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

[0193] En una realización, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización intracelular primaria. Los dominios de señalización intracelular primaria de ejemplo incluyen aquellos derivados de las moléculas responsables de la estimulación primaria, o simulación dependiente de antígeno. En una realización, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio intracelular coestimulador. Los dominios de señalización intracelular coestimulador de ejemplo incluyen los derivados de moléculas responsables de señales coestimuladoras, o estimulación independiente de antígeno. Por ejemplo, en el caso de un CART, un dominio de señalización intracelular primaria puede comprender secuencias citoplasmáticas del receptor de células T, y un dominio de señalización intracelular coestimulador puede comprender la secuencia citoplasmática de molécula coreceptora o molécula coestimuladora.

[0194] Dominios de señalización intracelular primaria pueden comprender motivos que son conocidos como motivos de activación basados en tirosina inmunoreceptores o ITAM. Ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias incluyen los derivados de CD3 zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (también conocido como "ICOS"), FcεRI, y CD66d. Otros ejemplos de moléculas que contienen un dominio de señalización intracelular primaria que son de uso particular en la invención incluyen los de DAP10, DAP12 y CD32.

[0195] "Aislado", tal como el término se utiliza en el presente documento, se refiere a un medio de ácido nucleico o polipéptido separado de al menos un compuesto contaminante. Con respecto a un ácido nucleico o polipéptido que existe en la naturaleza, significa libre de un compuesto con el que se produce en la naturaleza, en el que, en realizaciones, el compuesto contaminante es un polinucleótido o polipéptido. Con respecto a un ácido nucleico o polipéptido que se produce sintéticamente, significa libre de un reactivo o compuesto utilizado en su preparación, por ejemplo, un disolvente o reactivo de partida. Por ejemplo, un ácido nucleico o un polipéptido presente naturalmente en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o polipéptido parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Un ácido nucleico o proteína aislado pueden existir en forma sustancialmente purificada, o pueden existir en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, una célula huésped.

[0196] El término “dosis baja que aumenta la inmunidad" cuando se usa conjuntamente con un inhibidor de mTOR, por ejemplo, un inhibidor de mTOR alostérico, por ejemplo, RAD001 o rapamicina, o un inhibidor de mTOR catalítico, se refiere a una dosis de inhibidor de mTOR que parcialmente, pero no totalmente, inhibe la actividad de mTOR, por ejemplo, tal como se mide por la inhibición de la actividad de quinasa p70 S6. Los procedimientos para evaluar la actividad de mTOR, por ejemplo, mediante la inhibición de la quinasa p70 S6, se discuten en el presente documento. La dosis es insuficiente para dar como resultado una supresión inmunitaria completa, pero es suficiente para potenciar la respuesta inmunitaria. En un caso, la dosis baja que aumenta la inmunidad de un inhibidor de mTOR da como resultado una disminución en el número de células T positivas en PD-1 y/o un aumento en el número de células T negativas en PD-1, un aumento en la proporción de células T negativas en PD-1/células T positivas en PD-1; un aumento en el número de células T sin tratar; un aumento en el número de precursores de células T de memoria (por ejemplo, las células con una cualquiera o una combinación de las siguientes características: aumento de $CD62L^{alto}$, aumento de $CD127^{alto}$, aumento de CD27+, disminución KLRG1, y aumento de BCL2), o un aumento

en la expresión de una o más de marcadores de precursores de células T de memoria $CD62L^{alto}$, $CD127^{alto}$, CD27+, y BCL2; y/o una disminución en la expresión de marcador de precursor de células T de memoria KLRG1.

[0197] "Anclaje de membrana", tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a un polipéptido suficiente para anclar un dominio extracelular a la membrana plasmática.

[0198] "Dominio de unión a membrana", tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a un polipéptido o resto, por ejemplo, un grupo miristoilo, suficiente para anclar un dominio extracelular o intracelular a la membrana plasmática.

[0199] "Inhibidor basado en ácido nucleico", tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede inhibir la expresión de un gen diana, por ejemplo, una molécula inhibidora. Comprende ARN de doble cadena (dsRNA), que incluye ARN de horquilla corta (hcARN) y ARN de interferencia corto (siARN), ARN antisentido, y microARN (miARN). En un ejemplo, el inhibidor basado en ácido nucleico se une al ARNm diana e inhibe la producción de la misma proteína del mismo, por ejemplo, por escisión del ARNm diana.

[0200] "Refractario", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad, por ejemplo, cáncer, que no responde a un tratamiento. En realizaciones, un cáncer refractario puede ser resistente a un tratamiento antes o en el inicio del tratamiento. En otras realizaciones, el cáncer refractario puede volverse resistente durante un tratamiento. Un cáncer refractario también se llama un cáncer resistente.

[0201] "Recidivado" (“con recaída”) o una "recaída" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la reaparición de una enfermedad (por ejemplo, cáncer) o los signos y síntomas de una enfermedad, tal como el cáncer, después de un período de mejoría o respuesta, por ejemplo, después del tratamiento previo de una terapia, por ejemplo, terapia contra el cáncer. Por ejemplo, el periodo de respuesta puede implicar el nivel de células de cáncer que caen por debajo de un cierto umbral, por ejemplo, por debajo de 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1%. La reaparición puede implicar el nivel de células de cáncer que aumentan por encima de un cierto umbral, por ejemplo, por encima de 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1%.

[0202] "Sujeto", tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a organismos vivos en los que puede obtenerse una respuesta inmunitaria (por ejemplo, mamíferos). Ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, monos, chimpancés, perros, gatos, ratones, ratas, y especies transgénicas de los mismos. En una realización, el sujeto es un ser humano.

[0203] "Dominio transmembrana", tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a un polipéptido que atraviesa la membrana plasmática. En un ejemplo, une a una secuencia extracelular, por ejemplo, un dominio interruptor, un elemento de reconocimiento extracelular, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno, un dominio de unión a contraligando inhibidor o dominio ECD coestimulador, a una secuencia intracelular, por ejemplo, a un dominio interruptor o un dominio de señalización intracelular. Un dominio transmembrana de uso particular en esta invención puede incluir al menos la región o regiones transmembrana de, por ejemplo, la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8 (por ejemplo, CD8 alfa, CD8 beta), CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. En algunas realizaciones, un dominio transmembrana puede incluir al menos la región o regiones transmembrana de, por ejemplo, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 41BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LightR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R α, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f , ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/CBP.

[0204] "Forma de dosificación unitaria", tal como se utiliza el término en el presente documento se refiere a una dosificación para una administración adecuada. A modo de ejemplo una forma de dosificación unitaria puede ser un comprimido, una cápsula, o una cantidad de agente terapéutico dispuesto en un dispositivo de administración, por ejemplo, una jeringa o una bolsa de goteo intravenoso. En una forma de realización una forma de dosificación unitaria se administra en una sola administración. En una realización, más de una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, dos comprimidos, se pueden administrar de forma simultánea.

[0205] "Xenogénicos", tal como se utiliza el término en el presente documento, se refiere a un injerto procedente de un animal de una especie diferente.

[0206] "Receptor de antígeno quimérico regulable (RCAR)", tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a un conjunto de polipéptidos, típicamente dos en las realizaciones más simples, que cuando en una célula RCARX, proporciona a la célula RCARX una especificidad para una célula diana, típicamente una célula de cáncer, y con una generación o proliferación regulable de señal intracelular, que puede optimizar una propiedad de efectora inmunitaria de la célula RCARX. Una célula RCARX se basa, al menos en parte, en un

dominio de unión a antígeno para proporcionar especificidad a una célula diana que comprende el antígeno unido por el dominio de unión a antígeno. En una realización, un RCAR incluye un interruptor de dimerización que, en la presencia de una molécula de dimerización, puede acoplar un dominio de señalización intracelular al dominio de unión de antígeno.

[0207] "Dominio interruptor ("switch")" tal como ese término se utiliza en el presente documento, por ejemplo, cuando se hace referencia a un RCAR, se refiere a una entidad, típicamente una entidad basada en polipéptido, que, en presencia de una molécula de dimerización, se asocia con otro dominio interruptor. La asociación da lugar a un acoplamiento funcional de una primera entidad unida a, por ejemplo, fusionada a, un primer dominio interruptor, y una segunda entidad unida a, por ejemplo, fusionada a, un segundo dominio interruptor. Un primero y segundo dominios interruptor se denominan colectivamente como un interruptor de dimerización. En realizaciones, el primer y segundo dominios interruptor son los mismos entre sí, por ejemplo, son polipéptidos que tienen la misma secuencia de aminoácidos primaria, y se denominan colectivamente como un interruptor de homodimerización. En realizaciones, el primer y segundo dominios interruptor son diferentes entre sí, por ejemplo, son polipéptidos que tienen diferentes secuencias de aminoácidos primaria, y se denominan colectivamente como un interruptor de heterodimerización. En realizaciones, el interruptor es intracelular. En realizaciones, el interruptor es extracelular. En realizaciones, el dominio interruptor es una entidad basada en un polipéptido, por ejemplo, basado en FKBP o FRB, y la molécula de dimerización es una molécula pequeña, por ejemplo, un rapálogo. En realizaciones, el dominio interruptor es una entidad basada en un polipéptido, por ejemplo, un scFv que se une a un péptido myc, y la molécula de dimerización es un polipéptido, un fragmento del mismo, o un multímero de un polipéptido, por ejemplo, un ligando myc o multímeros de un ligando myc que se unen a uno o más de scFv myc. En realizaciones, el dominio interruptor es una entidad basada en un polipéptido, por ejemplo, un receptor de myc, y la molécula de dimerización es un anticuerpo o fragmentos del mismo, por ejemplo, anticuerpo para myc.

[0208] "Molécula de dimerización", tal como se usa ese término en el presente documento, por ejemplo, cuando se hace referencia a un RCAR, se refiere a una molécula que promueve la asociación de un primer dominio interruptor con un segundo dominio interruptor. En realizaciones, la molécula de dimerización no se produce de forma natural en el sujeto, o no se produce en concentraciones que darían lugar a una dimerización significativa. En realizaciones, la molécula de dimerización es una molécula pequeña, por ejemplo, rapamicina o un rapálogo, por ejemplo, RAD001.

[0209] Intervalos: a lo largo de esta descripción, los diversos aspectos de la invención pueden ser presentados en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad, y no debe interpretarse como una limitación inflexible sobre el alcance de la invención. Por consiguiente, la descripción de un intervalo debe considerarse que ha descrito específicamente todos los posibles subintervalos, así como valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo, tal como de 1 a 6 se debe considerar que tiene subintervalos específicamente descritos, tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Como otro ejemplo, un intervalo tal como 95-99% de identidad, incluye algo con 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad, e incluye los subintervalos, tales como 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% y 98-99 % de identidad. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

DESCRIPCIÓN

Receptor de Antígeno quimérico (CAR)

[0210] La presente descripción abarca una construcción de ADN recombinante que comprende secuencias que codifican un CAR, en el que el CAR comprende un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo, molécula de anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, fragmento TCR o TCR) que se une específicamente a un antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno tumoral que se describe en el presente documento, donde la secuencia del dominio de unión a antígeno es contigua y en el mismo marco de lectura que una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio coestimulador de señalización y/o un dominio de señalización primaria, por ejemplo, una cadena zeta. El dominio coestimulador de señalización se refiere a una porción del CAR que comprende al menos una porción del dominio intracelular de una molécula coestimuladora.

[0211] En aspectos específicos, una construcción de CAR de la descripción comprende un dominio scFv, en el que el scFv puede estar precedido por una secuencia líder opcional, tal como la proporcionada en la SEQ ID NO: 2, y seguido por una secuencia de bisagra opcional, tal como la proporcionada en SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10, una región transmembrana tal como la proporcionada en la SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 42, un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio coestimulador de señalización, que incluye SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 44 y una secuencia de CD3 zeta que incluye SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20, por ejemplo, en el que los dominios son contiguos con y en el mismo marco de lectura para formar una proteína de fusión única.

[0212] En un aspecto, las construcciones de CAR de ejemplo comprenden una secuencia líder opcional (por

ejemplo, una secuencia líder que se describe en el presente documento), un dominio de unión a antígeno extracelular (por ejemplo, un dominio de unión a antígeno que se describe en el presente documento), una bisagra (por ejemplo, una región bisagra descrita en el presente documento), un dominio transmembrana (por ejemplo, un dominio transmembrana que se describe en el presente documento), y un dominio estimulador intracelular (por ejemplo, un dominio estimulador intracelular descrito en el presente documento). En un aspecto, una construcción de CAR de ejemplo comprende una secuencia líder opcional (por ejemplo, una secuencia líder que se describe en el presente documento), un dominio de unión a antígeno extracelular (por ejemplo, un dominio de unión a antígeno que se describe en el presente documento), una bisagra (por ejemplo, una región bisagra que se describe en el presente documento), un dominio transmembrana (por ejemplo, un dominio transmembrana que se describe en el presente documento), un dominio coestimulador de señalización intracelular (por ejemplo, un dominio coestimulador de señalización que describe en el presente documento) y/o un dominio de señalización intracelular primaria (por ejemplo, un dominio de señalización primaria descrito en el presente documento).

[0213] Una secuencia líder de ejemplo se proporciona como SEQ ID NO: 2. Un ejemplo de secuencia de bisagra/espaciador se proporciona como SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10. Una secuencia de dominio transmembrana de ejemplo se proporciona como SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 42. Una secuencia de ejemplo del dominio de señalización intracelular de la proteína 4-1BB se proporciona como SEQ ID NO: 14. Una secuencia de ejemplo del dominio de señalización intracelular de CD27 se proporciona como SEQ ID NO: 16. Una secuencia del dominio CD3zeta de ejemplo se proporciona como SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20. Un dominio de señalización intracelular de ejemplo de CD28 se proporciona como SEQ ID NO: 44. Un ejemplo de dominio de señalización intracelular de ICOS se proporciona como SEQ ID NO: 40.

[0214] Las secuencias de algunos ejemplos de diversos componentes de CAR de la presente descripción, y los ácidos nucleicos que los codifican se indican en la Tabla 1, donde aa es sinónimo de aminoácidos, y na representa ácidos nucleicos que codifican el péptido correspondiente.

Tabla 1. Secuencias de diversos componentes del CAR (aa - aminoácidos, na - ácidos nucleicos que codifica la proteína correspondiente)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
1	Promotor EF-1 (na)	CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCC ACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGG TGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCG TGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATA TAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTG CCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTG GCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCAC CTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAG TGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCC TCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGT GCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAA GTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTT TTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACT GGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCG TCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCC ACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCT GGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGC AAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGC CGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGG CGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAG GGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTA CCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAG TACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTT TCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCA CTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCT TGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTC CATTTCAGGTGTCGTGA
2	Líder (aa)	MALPVTALLLPLALLLHAARP

3	Líder (aa)	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGC TGCATGCCGCTAGACCC
4	Bisagra CD8 (aa)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
5	Bisagra CD8 (na)	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCAT CGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGC GGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTG AT
6	Bisagra Ig4 (aa)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKM
7	Bisagra Ig4 (na)	GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAG TTCCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAG GACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTG GTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGA GGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGG TGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCC CCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCT GCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCT GTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACC GTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTC CGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCC TGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG
8	Bisagra IgD (aa)	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKK EKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCF VVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLP RSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSD PPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGST TFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTD H
9	Bisagra IgD (na)	AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCCAGGCATCTAGTGTTCCTACT GCACAGCCCCAGGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGC ACCTGCCACTACGCGCAATACTGGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGA AAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAGGAAGAGAGGGAGACCAA GACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATCT CTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCAC CTTTACATGTTTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTG ACTTGGGAGGTTGCCGGAAAGGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGA AGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCTCAGAGCCAGCACTC AAGACTCACCCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGT CACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCCACAGCGTCTGAT GGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCCAGGCACCAGTTAAGCTTAGCCT GAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCT CTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCCAACATCTTGCTCAT GTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCGCTC CAGCCCGGCCCCCACCCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCT GGAGTGTCTTAAGGGTCCCAGCACCACCTAGCCCCCAGCCAGCCA CATACACCTGTGTTGTGTCCCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAA ATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACGTGACTGACCATT
10	Bisagra/enlazador GS (aa)	GGGGSGGGGS
11	Bisagra/enlazador GS (na)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC

12	CD8TM (aa)	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
13	CD8TM (na)	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTT CTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGC
14	Dominio intracelular 4-1BB (aa)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
15	Dominio intracelular 4-1BB (na)	AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATT ATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTC CCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
16	CD27 (aa)	QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP
17	CD27 (na)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAA GACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTA TGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC
18	CD3-zeta (aa)	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGI QGLSTATKDTYDALHMQALPPR
19	CD3-zeta (na)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCA GGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAC AGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGT CAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGA TTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGG CTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC CTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
20	CD3-zeta (aa)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL QGLSTATKDTYDALHMQALPPR
21	CD3-zeta (na)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCA GGGCCAG AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTA CGATGTTT TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCG AGAAGGA AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAG ATGGCGG AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGC AAGGGGC ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCT ACGACGC CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
22	Enlazador	GGGGS
23	Enlazador	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC
24	Dominio extracelular PD-1 (aa)	Pgwfldspdrpwnpptfspallvvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedr qdcrfrvtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpsps gqfqtlv
25	Dominio extracelular PD-1 (na)	Cccggatggtttctggactctccggatcgcccgtggaatcccccaaccttctcaccggcactcttggtt tgagggcgataatgcgaccttcacgtgctcgttctccaacacctccgaatcattcgtgctgaactggtac tgagcccgtcaaaccagaccgacaagctcgccgcgtttccggaagatcggtcgcaaccgggacagg cggttccgcgtgactcaactgccgaatggcagagacttccacatgagcgtggtccgcgctaggcgaa ctccgggacctacctgtgcggagccatctcgctggcgcctaaggcccaaatcaaagagagcttgagg aactgagagtgaccgagcgcagagctgaggtgccaactgcacatccatccccatcgcctcggcctgc gcagtttcagaccctggtc

26	PD-1 CAR (aa) con señal	Malpvtalllplalllhaarppgwfldspdrpwnpptfspallvvtegdnatftcsfsntsesfvlnw psnqtdklaafpedrsqpgqdcrfrvtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikesl vterraevptahpspsprpagqfqtlvtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldf iwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfs apaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeays kgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
27	PD-1 CAR (na)	Atggccctccctgtcactgccctgcttctcccccctcgcactcctgctccacgccgctagaccacccggatg ttctggactctccggatcgcccgtggaatcccccaaccttctcaccggcactcttggttgtgactgagggcg aatgcgaccttcacgtgctcgttctccaacacctccgaatcattcgtgctgaactggtaccgcatgagcccg aaaccagaccgacaagctcgccgcgtttccggaagatcggtcgcaaccgggacaggattgtcggttccg tgactcaactgccgaatggcagagacttccacatgagcgtggtccgcgctaggcgaaacgactccggg tacctgtgcggagccatctcgctggcgcctaaggcccaaatcaaagagagcttgagggccgaactgag gaccgagcgcagagctgaggtgccaactgcacatccatccccatcgcctcggcctgcggggcagttt ccctggtcacgaccactccggcgccgcgcccaccgactccggccccaactatcgcgagccagcccc gctgaggccggaagcatgccgccctgccgccggaggtgctgtgcatacccggggattggacttcgca gacatctacatttgggctcctctcgccggaacttgtggcgtgctccttctgtccctggtcatcaccctgtac agcggggtcggaaaaagcttctgtacattttcaagcagcccttcatgaggcccgtgcaaaccacccagg aggacggttgctcctgccggttccccgaagaggaagaaggaggttgcgagctgcgcgtgaagttctcc agcgccgacgccccgcctataagcagggccagaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacgg gaagagtacgatgtgctggacaagcggcgcggccgggaccccgaaatgggcgggaagcctagaag gaaccctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaaggacaagatggccgaggcctactccgaaatt atgaagggagagcggcggaggggaaaggggcacgacggcctgtaccaaggactgtccaccgccac ggacacatacgatgccctgcacatgcaggcccttcccccctcgc
28	Enlazador	(Gly-Gly-Gly-Ser)n, donde n = 1-10
29	Enlazador	(Gly4 Ser)4
30	Enlazador	(Gly4 Ser)3
31	Enlazador	(Gly3Ser)
32	poliA (2000 A)	a[a]1999
33	poliA (150 A)	a[a]149
34	poliA (5000 A)	a[a]4999
35	poliA (100 T)	t[t]99
36	poliA (500 T)	t[t]499
37	poliA (64 A)	a[a]63
38	poliA (400 A)	a[a]399
39	PD1 CAR (aa)	Pgwfldspdrpwnpptfspallvvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpg qdcrfrvtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpa gqfqtlvtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitly ckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgr reeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglst atkdtydalhmqalppr
40	Dominio ICOS ICD (aa)	T K K K Y S S S V H D P N G E Y M F M R A V N T A K R L T D V T L
41	Dominio ICOS ICD (na)	ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATG GAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTA
42	Dominio ICOS TM (aa)	T T T P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A C R P A A G G A V H T R G L D F A C D F W L P I G C A A F V V V C I L G C I L I C W L
43	Dominio ICOS TM (na)	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGC CCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACG GGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTCTGGTTACCCATAGGATGTGCAGCCTTTGT GTAGTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTT
44	Dominio CD28 (aa)	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
45	Dominio CD28 (na)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGC CCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGC CCTATCGCTCC

46	Dominio ICOS (FMFM) ICD (aa) (“FMFM” descrita como SEQ ID NO: 47)	TKKKYSSSVHDPNGEFMFMRAVNTAKKSRLTDVTL

[0215] En ejemplos, los fragmentos scFv de CAR se clonan en vectores lentivirales para crear una construcción de CAR de longitud completa en un solo marco de codificación, y usando un promotor, por ejemplo, promotor EF1 alfa para la expresión (SEQ ID NO: 1).

[0216] En un aspecto, la presente descripción abarca una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, en el que la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, descrito en el presente documento, que es contigua con y en el mismo marco de lectura que una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular.

[0217] En un aspecto, la presente descripción abarca una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, en el que la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión a antígeno, en el que la secuencia es contigua y está en el mismo marco de lectura que la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular. Un dominio de señalización intracelular a modo de ejemplo que se puede utilizar en el CAR incluye, pero no se limita a, uno o más dominios de señalización intracelulares de, por ejemplo, CD3-zeta, CD28, CD27, 4-1BB, ICOS, y similares. En algunos casos, el CAR puede comprender cualquier combinación de CD3-zeta, CD28, 41BB, ICOS y similares.

[0218] En un ejemplo, el CAR comprende un dominio ICOS y se proporciona en una célula T CD4+. En un ejemplo, el CAR comprende un dominio CD28 o 4-1BB, y se proporciona en una célula T CD8+.

[0219] Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las moléculas deseadas se pueden obtener usando procedimientos recombinantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante el cribado de bibliotecas de células que expresan la molécula de ácido nucleico, mediante la derivación de la molécula de ácido nucleico de un vector conocido por incluir la misma, o mediante el aislamiento directamente de células y tejidos que contienen la misma, utilizando técnicas estándar. Alternativamente, el ácido nucleico de interés puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.

[0220] La presente descripción incluye construcciones de vectores retrovirales y lentivirales que expresan un CAR que se pueden transducir directamente en una célula.

[0221] La presente descripción también incluye una construcción de ARN que se pueden transfectar directamente en una célula. Un procedimiento para generar ARNm para el uso en la transfección implica la transcripción *in vitro* (IVT) de una plantilla con cebadores diseñados especialmente, seguido de adición de poliA, para producir una construcción que contiene la secuencia 3' y 5' no traducida (“UTR') (por ejemplo, una UTR 3' y/o 5' descrita en el presente documento), un bloqueador en 5’ (por ejemplo, un bloqueador en 5' que se describe en el presente documento) y/o sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) (por ejemplo, un IRES que se describe en el presente documento), el ácido nucleico que se expresa y una cola de poliA, típicamente de 50-2000 bases de longitud (SEQ ID NO: 32). El ARN así producido puede transfectar eficientemente diferentes tipos de células. En un ejemplo, la plantilla incluye secuencias para el CAR. En un ejemplo, un vector de ARN CAR se transduce en una célula, por ejemplo, una célula T mediante electroporación.

DOMINIO DE UNIÓN A ANTÍGENO

[0222] Los CAR descritos en el presente documento pueden incluir un dominio de unión a antígeno en la región extracelular.

[0223] En un ejemplo, el dominio de unión a antígeno es un anticuerpo murino o fragmento de anticuerpo descritos en el presente documento. En un ejemplo, el dominio de unión a antígeno es un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo.

[0224] La elección de un dominio de unión a antígeno puede depender del tipo y número de ligandos o receptores que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede ser escogido para reconocer un antígeno que actúa como un marcador de superficie celular en las células diana asociadas con un estado patológico particular. Ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos o receptores incluyen un marcador de superficie celular asociado con un estado patológico particular, por ejemplo, marcadores de la superficie celular para enfermedades víricas, enfermedades bacterianas, infecciones parasitarias, enfermedades autoinmunes y trastornos asociados con la proliferación celular no deseada, por ejemplo, un cáncer, por ejemplo, un cáncer que se describe en el presente documento.

[0225] En ciertos aspectos, los antígenos de trastorno proliferativo de la presente descripción se derivan de cánceres que incluyen, pero no se limitan a, melanoma primaria o metastásica, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón (por ejemplo, NSCLC o SCLC), cáncer de hígado, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias, mieloma múltiple, glioblastoma, neuroblastoma, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer renal, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y adenocarcinomas, tales como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de colon y similares. En algunas realizaciones, el cáncer es leucemia linfoide aguda de células B ("BALL"), leucemia linfoide aguda de células T ("TALL"), leucemia linfoide agua (ALL), leucemia mieloide aguda (AML); una o más leucemias crónicas, que incluyen, pero no limitado a, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL); cánceres hematológicos adicionales o afecciones hematológicas, que incluyen, pero no limitado a, leucemia prolinfocítica de células B, neoplasma de células dendríticas plasmacitoides básticas, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, lifoma folicular de célula pequeña o célula grande, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma plasmablástico, neoplasma de células dendríticas plasmacitoides, macroglobulinemia de Waldenstrom.

[0226] En una realización, el antígeno tumoral comprende uno o más epítopos antigénicos del cáncer inmunológicamente reconocidos por los linfocitos infiltrantes en tumor (TIL) derivados de un tumor de cáncer de un mamífero.

[0227] Los antígenos tumorales son proteínas que son producidas por las células tumorales que provocan una respuesta inmunitaria, particularmente de respuestas inmunes mediadas por células T. La selección del dominio de unión a antígeno de la descripción dependerá del tipo particular de cáncer que va a tratarse. Los antígenos tumorales son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, un antígeno asociado a glioma, antígeno carcinoembrionario (CEA), EGFRvIII, IL-11Ra, IL-13ra, EGFR, B7H3, Kit, CA-IX, CS-1, MUC1, BCMA, bcr-abl, HER2, gonadotropina coriónica β-humana, alfafetoproteína (AFP), ALK, CD19, CD123, ciclina B1, AFP reactiva a lectina, antígeno 1 relacionado con Fos, ADRB3, tiroglobulina, EphA2, RAGE-1 , RU1, RU2, SSX2, AKAP-4, LCK, OY-TES1, PAX5, SART3, CLL-1, fucosil GM1, GloboH, MN-CA IX, EpCAM, EVT6-AML, TGS5, telomerasa transcriptasa inversa humana, ácido plisiálico, PLAC1, RU1, RU2 (AS), carboxil esterasa intestinal, lewisY, sLe, LY6K, mut hsp70-2, M-CSF, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, prostasa, antígeno específico de la próstata (PSA), PAX3, PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, LMP2, NCAM, p53, mutante de p53, mutante de Ras, gp100, prosteína, OR51E2, PANX3, PSMA, PSCA, Her2/neu, hTERT, HMWMAA, HAVCR1, VEGFR2, PDGFR-beta, survivina y telomerasa, legumaína, HPV E6, E7, proteína de esperma 17, SSEA-4, tirosinasa, TARP, WT1, antígeno-1 de tumor de carcinoma de próstata (PCTA-1), ML-IAP, MAGE, MAGE-A1, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MelanA/MART1, XAGE1, ELF2M, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, elastasa de neutrófilos, puntos de interrupción de translocación en el sarcoma, NY-BR-1, EfrinaB2, CD20, CD22, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD97, CD171, CD179a, receptor de andrógenos, factor de crecimiento de insulina (IGF)-I, IGF-II, receptor de IGF-I, GD2, o-acetil-GD2, GD3, GM3, GPRC5D, GPR20, CXORF61, receptor de folato (FRa), receptor de folato beta, ROR1, Flt3, TAG72, TN Ag, Tie 2, TEM1, TEM7R, CLDN6, TSHR, UPK2 y mesotelina. En una realización preferida, el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en receptor de folato (FRa), mesotelina, EGFRvIII, IL-13ra, CD123, CD19, CD33, BCMA, GD2, CLL-1, CA-IX, MUC1, HER2, y cualquier combinación de los mismos.

[0228] En una realización, el antígeno tumoral comprende uno o más epítopos antigénicos de cáncer asociados con un tumor maligno. Los tumores malignos expresan una serie de proteínas que pueden servir como antígenos diana para un ataque inmunitario. Estas moléculas incluyen, pero no están limitadas a, antígenos específicos de tejido, tales como MART-1, tirosinasa y GP 100 en melanoma y fosfatasa ácida prostática (PAP) y antígeno específico de próstata (PSA) en el cáncer de próstata. Otros antígenos diana incluyen moléculas relacionadas con transformación, tales como el oncogén HER-2/Neu/ErbB-2. Sin embargo, otro grupo de antígenos diana son antígenos onco-fetales, tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA). En el linfoma de células B, la inmunoglobulina idiotipo específica de tumor constituye verdaderamente un antígeno de inmunoglobulina específico de tumor que es único para el tumor individual. Los antígenos de diferenciación de células B, tales como CD19, CD20 y CD37 son otros candidatos para antígenos diana en linfoma de células B.

[0229] Los ejemplos no limitantes de antígenos tumorales incluyen los siguientes: antígenos de Diferenciación, tales como MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1 TRP-2 y antígenos multilinaje específicos de tumores, tales como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; antígenos embrionarios sobreexpresados, tales como CEA; oncogenes sobreexpresados y genes supresores de tumores mutados, tales como p53, Ras, HER-2/neu; antígenos tumorales únicos que resultan de translocaciones cromosómicas; tales como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; y antígenos virales, tales como antígenos del virus de Epstein Barr EBVA y antígenos del virus del papiloma humano (HPV) E6 y E7. Otros antígenos grandes basados en proteínas incluyen TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, beta-catenina, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteína, beta-HCG , BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\P1, CO-029, FGF-5, G250, GA733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90\proteína de unión a Mac-2\proteína asociada a ciclofilina C, TAAL6,

TAG72, TLP y TPS.

[0230] En algunas realizaciones, el antígeno tumoral es un antígeno tumoral que se describe en la Solicitud Internacional WO2015/142675. En algunas realizaciones, el antígeno tumoral se selecciona de entre uno o más de: CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (también se hace referencia como CD2 subconjunto 1, CRACC, SLAMF7, CD319, y 19A24); moleula 1 similar a Lectina de tipo C (CLL-1 o CLECL1); CD33; variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII); ganglióside G2 (GD2); ganglióside GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3) bDGalp (1-4) bDGlcp (1-1) Cer); maduración de células B del miembro de la Familia de receptores de TNF (BCMA); Antígeno Tn ((Tn Ag) o (GalNAcα-Ser/Thr)); antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA); receptor huérfano 1 similar a receptor tirosina quinasa (ROR1); tirosina quinasa 3 similar a Fms (FLT3); glicoproteína 72 asociada a tumor (TAG72); CD38; CD44v6; antígeno carcinoembrionario (CEA); molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13 (IL-13Ra2 o CD213A2); mesotelina; receptor alfa de interleucina 11 (IL-11Ra); antígeno de células madre de próstata (PSCA); Serina proteasa 21 (Testisin o PRSS21); receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2); antígeno de Lewis (Y); CD24; receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-beta); antígeno-4 embrionario de etapa específica (SSEA-4); CD20; receptor alfa de folato; Receptor de la tirosina-proteína quinasa ERBB2 (Her2/neu); mucina 1, asociada a la superficie de la célula (MUC1); receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); molécula de adhesión celular neural (NCAM); prostasa; ácida prostático fosfatasa (PAP); factor de elongación 2 mutado (ELF2M); Efrina B2; proteína de activación de fibroblastos alfa (FAP); receptor de factor de crecimiento 1 similar a insulina (receptor de IGF-I), anhidrasa carbónica IX (CAIX); Proteasoma (prosoma, macropain) Subunidad, tipo Beta, 9 (LMP2); glicoproteína 100 (gp100); proteína de fusión a oncogén que consiste de la región agrupada de puntos de rotura (BCR) y homólogo 1 del oncogén virald e leucemia murina Abelson (Abl) (bcr-abl); tirosinasa; receptor de efrina tipo-A (EphA2); Fucosil GM1; molécula de adhesión de sialil Lewis (SLE); ganglióside GM3 (aNeu5Ac(2-3) bDGalp(1-4) bDGlcp(1-1)Cer); transglutaminasa 5 (TGS5); antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA); O-acetil-ganglióside GD2 (OAcGD2); receptor beta de folato; marcador endotelial tumoral 1 (TEM1/CD248); marcador endotelial tumoral 7 relacionado (TEM7R); claudina 6 (Cldn6); receptor de hormona estimulante del tiroides (TSHR); receptor acoplado a proteína G, clase C grupo 5, miembro D (GPRC5D); marco de lectura abierto 61 de cromosoma X (CXORF61); CD97; CD179a; quinasa del linfoma anaplásico (ALK); Ácido polisiálico; placenta-específico 1 (PLAC1); porción de hexasacárido de GloboH glicoceramida (GloboH); antígeno de diferenciación de glándula mamaria (NY-BR-1); uroplakin 2 (UPK2); receptor celular 1 del virus de la hepatitis A (HAVCR1); adrenoceptor beta 3 (ADRB3); pannexina 3 (PANX3); receptor 20 acoplado a proteína G (GPR20); complejo de antígeno de linfocitos 6, locus K 9 (LY6K); Receptor olfativo 51E2 (OR51E2); proteína del marco de lectura alternativo gamma de TCR (TARP); proteína tumoral de Wilms (WT1); antígeno 1 de cáncer/testículo (NY-ESO-1); antígeno 2 de cáncer/testículo (LAGE-1a); Antígeno 1 asociado a melanoma (MAGE-A1); variante del gen 6 de translocación de ETS, situado en el cromosoma 12p (ETV6-AML); proteína de esperma 17 (SPA17); familia de antígeno x, miembro 1A (XAGE1); receptor de la superficie celular 2 de unión a angiopoyetina (Tie 2); antígeno-1 de cáncer de melanoma de testículo (MAD-CT-1); antígeno-2 de cáncer de melanoma de testículo (MAD-CT-2); antígeno 1 relacionado con Fos; proteína tumoral p53 (p53); p53 mutante; prosteina; survivina; telomerasa; antígeno-1 de tumor de carcinoma de próstata (PCTA-1 o galectina 8), antígeno de melanoma reconocido por células T 1 (MelanA o MARTI); Sarcoma de rata (Ras) mutante; transcriptasa de telomerasa inversa humana (hTERT); puntos de interrupción de translocación de sarcoma; inhibidor de melanoma de la apoptosis (ML-IAP); ERG (proteasa transmembrana, gen de fusión de serina 2 (TMPRSS2) ETS); N-acetil glucosaminil-transferasa V (NA17); proteína de caja emparejada Pax-3 (PAX3); Receptor de andrógenos; Ciclina B1; v-myc homólogo derivado de neuroblastoma de oncogén viral de mielocitomatosis aviar v-myc (MYCN); Miembro C de la familia de homólogos Ras (RhoC); Proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP-2); citocromo P450 1B1 (CYP1B1); factor de unión a CCCTC similar a (proteína de dedos de zinc) (BORIS o Brother of the Regulator of Imprinted Sites), antígeno de carcinoma de células escamosas reconocido por células T 3 (SART3); proteína de caja emparejada Pax-5 (PAX5); proteína de unión a proacrosina sp32 (OY-TES1); proteína tirosina quinasa específica de linfocitos (LCK); una proteína quinasa de anclaje 4 (AKAP-4); sarcoma sinovial, punto de interrupción de X 2 (SSX2); Receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE-1); ubicua renal 1 (RU1); ubicua renal 2 (RU2); legumaina; virus del papiloma humano E6 (HPV E6); virus del papiloma humano E7 (HPV E7); carboxil esterasa intestinal; proteína de choque térmico 70-2 mutada (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; receptor 1 similar a inmunoglobulina asociada a leucocitos (LAIR1); fragmento Fc de receptor de IgA (FCAR o CD89); miembro 2 de la subfamilia A de receptor similar a inmunoglobulina de leucocito (LILRA2); miembro f de la familia similar a moléculas CD300 (CD300LF); miembro A de la familia 12 del dominio de lectina de tipo C (CLEC12A); antígeno 2 células del estroma de médula ósea (BST2); similar a receptor de hormona similar a mucina que contene el módulo similar a EGF 2 (EMR2); antígeno de linfocitos 75 (LY75); Glipicano-3 (GPC3); similar al receptor de Fc 5 (FCRL5); y el polipéptido 1 similar a inmunoglobulina lambda (IGLL1). En algunas realizaciones, el antígeno tumoral es GFRa4 (ver Spinasanta, "The Endocrine Society's 97th Annual Meeting & Expo: Targeted Therapies in Medullary Thyroid Cancer", 13 de marzo de 2015).

[0231] En algunas realizaciones, el antígeno tumoral unido por la molécula de CAR se selecciona de entre uno o más de: TSHR, CD171, CS-1, CLL-1, GD3, Tn Ag, FLT3, CD38, CD44v6, B7H3, KIT, IL-13Ra2, IL-11Ra, PSCA, PRSS21, VEGFR2, LewisY, CD24, PDGFR-beta, SSEA-4, MUC1, EGFR, NCAM, CAIX, LMP2, EphA2, fucosil GM1, SLE, GM3, TGS5, HMWMAA, o-acetil-GD2, receptor beta de folato, TEM1/CD248, TEM7R, Cldn6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, ácido polisiálico, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3,

GPR20, LY6K , OR51E2, TARP, WT1, ETV6-AML, proteína de esperma 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, antígeno 1 relacionado con FOS, mutante p53, hTERT, puntos de interrupción de la translocación de sarcoma, ML-IAP, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, receptor de andrógenos, ciclina B1, MYCN, RhoC, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1 , FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5 e IGLL1.

[0232] En ciertas realizaciones, el antígeno tumoral unido por la molécula de CAR se selecciona de entre uno o más de: TSHR, Cldn6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, ácido polisiálico, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K y OR51E2.

[0233] Dependiendo del antígeno deseado a reconocer, el CAR de la descripción puede diseñarse para incluir el dominio de unión a antígeno apropiado que es específico para el antígeno diana deseado.

[0234] Un CAR tal como se describe en el presente documento, puede incluir un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que se une a un péptido presentado por MHC. Normalmente, los péptidos derivados de proteínas endógenas llenan los bolsillos de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I, y son reconocidos por receptores de células T (TCR) en los linfocitos T CD8 +. Los complejos MHC de clase I son expresados de forma constitutiva por todas las células nucleadas. En el cáncer, los péptido/complejo de MHC específiso de virus y/o específicos de tumores representan una clase única de las dianas de la superficie de células para la inmunoterapia. Se han descrito anticuerpos similares a TCR que reconocen péptidos derivados de antígenos virales o tumorales en el contexto de antígeno leucocitario humano (HLA) HLA-A1 o HLA-A2 (véase, por ejemplo, Sastry et al, J Virol 2011 85 (5): 1935-1942; Sergeeva et al, Bood, 2011 117 (16): 4.262 a 4.272; Verma et al, J Immunol 2010 184 (4): 2156-2165; Willemsen et al, gene Ther 2001 8 (21): 1601-1608; Dao et al, Sci Transl Med 2013 5 (176): 176ra33; Tassev et al, Cancer gene Ther 2012 19 (2): 84-100). Por ejemplo, un anticuerpo similar a TCR puede ser identificado a partir del cribado de una biblioteca, tal como una biblioteca expresada en fagos de scFv humanos. En consecuencia, la presente descripción proporciona un CAR descrito en el presente documento, que comprende un dominio que se une a un péptido presentado en MHC de una molécula seleccionada de cualquier antígeno tumoral que se ha descrito anteriormente que se expresa intracelularmente, por ejemplo, p53, BCR-Abl, Ras, K-ras, y c-met.

[0235] En un aspecto, la célula CARX descrita en el presente documento puede comprender además un segundo CAR, por ejemplo, un segundo CAR que incluye un dominio de unión a antígeno diferente, por ejemplo, a la misma diana (un antígeno asociado a cáncer tal como se describe en el presente documento) o una diana diferente (por ejemplo, CD19, CD123, CD22, CD30, CD34, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, Tn Ag, PSMA, ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6 , CEA, EpCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, mesotelina, IL-11Ra, PSCA, VEGFR2, LewisY, CD24, PDGFR-beta, SSEA-4, CD20, receptor alfa de folato, erbB2 (Her2/neu), MUC1, EGFR, NCAM, prostasa, PAP, ELF2M, Efrina B2, receptor de IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, tirosinasa, EphA2, fucosil GM1, SLE, GM3, TGS5, HMWMAA, o-acetil-GD2, receptor beta de folato, TEM1/CD248, TEM7R, Cldn6, TSHR, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, ácido plisiálico, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, legumaina, HPV E6, E7, MAGE-A1, MAGE A1, ETV6-AML, proteína de esperma 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, antígeno 1 relacionado con Fos, p53, p53 mutante, prosteína, survivina y telomerasa, PCTA-1/galectina 8, MelanA/MART1, Ras mutante, hTERT, puntos de interrupción de translocación sarcoma, ML-IAP, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, receptor de andrógenos, ciclina B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, transcriptasa inversa de telomerasa humana, RU1, RU2, carboxil esterasa intestinal, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, o IGLL1). En un ejemplo, cuando la célula CARX comprende dos o más CAR diferentes, los dominios de unión a antígeno de los diferentes CARs pueden ser tales que los dominios de unión a antígeno no interactúan uno con el otro. Por ejemplo, una célula que expresa un primer y segundo CAR puede tener un dominio de unión a antígeno del primer CAR, por ejemplo, como un fragmento, por ejemplo, un scFv, que no forma una asociación con el dominio de unión a antígeno del segunda CAR, por ejemplo, el dominio de unión a antígeno del segunda CAR es un VHH.

Dominios de unión a antígeno derivados de una molécula de anticuerpo

[0236] El dominio de unión a antígeno puede derivarse de una molécula de anticuerpo, por ejemplo, uno o más de anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de dominio único, por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable (VHH), por ejemplo, de origen camélido o humano. En algunos casos, es beneficioso para el dominio de unión a antígeno que derive de la misma especie en la que en última instancia se utilizará el CAR, por ejemplo, para su uso en seres humanos, puede ser beneficioso para el dominio de unión a antígeno del CAR, descrito en el presente documento, comprender un dominio de unión a antígeno humano o humanizado. Los anticuerpos pueden obtenerse utilizando técnicas conocidas en el sector.

[0237] En realizaciones, el dominio de unión a antígeno comprende un fragmento de un anticuerpo que es suficiente para conferir reconocimiento y unión específica al antígeno diana. Los ejemplos de un fragmento de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, un fragmento Fab, Fab', $F(ab')_2$ o Fv, un fragmento de anticuerpo scFv, un

anticuerpo lineal, un anticuerpo de dominio único, tal como un SDAB (ya sea VL o VH), un dominio VHH de camélidos, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0238] En una realización, el dominio de unión a antígeno es un "scFv", que puede comprender una proteína de fusión que comprende una cadena VL y una cadena VH de un anticuerpo, en la que el VH y VL están, por ejemplo, unidas a través de un enlazador polipéptido flexible corto, por ejemplo, un enlazador descrito en el presente documento. El scFv es capaz de ser expresado como un polipéptido de cadena única y retiene la especificidad del anticuerpo intacto del que deriva. Además, las cadenas variables VL y VH se pueden unir en cualquier orden, por ejemplo, con respecto a los extremos N-terminales y C-terminales del polipéptido, el scFv puede comprender VL-enlazador-VH o puede comprender VH-enlazador-VL. Un scFv se puede preparar según el procedimiento conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Bird et al, (1988) Science 242: 423-426 y Huston et al, (1988) Proc Natl Acad Sci. USA. 85: 5879-5883).

[0239] Tal como se describió anteriormente y en otros puntos, las moléculas scFv pueden ser producidas mediante la unión de las cadenas VH y VL juntas utilizando enlazadores polipeptídicos flexibles. En algunas realizaciones, las moléculas scFv comprenden un enlazador polipéptido flexible con una longitud y/o composición de aminoácidos optimizadas. La longitud del enlazador polipeptídico flexible puede afectar en gran medida a cómo las regiones variables de un scFv se pliegan e interactúan. De hecho, si se emplea un enlazador polipeptídico corto (por ejemplo, entre 5-10 aminoácidos, se impide el plegado intracatenario. Para ejemplos de orientación del enlazador y tamaño, véase, por ejemplo, Hollinger et al 1993 Proc Natl Acad Sci USA. 90: 6444-6448, publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nos. 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794, y las publicaciones PCT Nos. WO2006/020258 y WO2007/024715. En una realización, el enlazador peptídico de scFv consiste en aminoácidos, tales como residuos de glicina y/o serina, utilizados solos o en combinación, para unir regiones de cadena pesada variable y cadena ligera variable juntas. En una realización, el enlazador polipeptídico flexible es una enlazador Gly/Ser y, por ejemplo, comprende la secuencia de aminoácidos (Gly-Gly-Gly-Ser)n (SEQ ID NO: 28), donde n es un entero positivo igual o mayor que 1. Por ejemplo, n = 1, n = 2, n = 3. n = 4, n = 5 y n = 6, n = 7, n = 8, n = 9 y n = 10. En una realización, los enlazadores polipeptídicos flexibles incluyen, pero no se limitan a, (Gly4Ser)4 (SEQ ID NO. 29) o (Gly4Ser)3 (SEQ ID NO: 30). En otra realización, los enlazadores incluyen múltiples repeticiones de (Gly2Ser), (GlySer) o (Gly3Ser) (SEQ ID NO: 31).

[0240] En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno son moléculas de unión a antígeno de dominio único (SDAB). Una molécula de SDAB incluye moléculas cuyas regiones determinantes complementarias son parte de un polipéptido de dominio único. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, los dominios variables de cadena pesada, moléculas de unión desprovistas de forma natural de cadenas ligeras, dominios únicos derivados de anticuerpos convencionales de 4 cadenas, dominios modificados y andamios de dominio único distintos de los derivados de anticuerpos (por ejemplo, se describen en más detalle a continuación). Las moléculas de SDAB pueden ser cualquiera de la técnica, o las futuras moléculas de dominio único. Las moléculas de SDAB pueden derivarse de cualquier especie, incluyendo, pero no limitado a, ratón, ser humano, camello, llama, pescados, tiburón, cabra, conejo y bovino. Este término también incluye moléculas de anticuerpo de dominio único de origen natural de especies distintas de *Camelidae* y tiburones.

[0241] En un aspecto, una molécula de SDAB se puede derivar de una región variable de la inmunoglobulina que se encuentra en los peces, tal como, por ejemplo, la que deriva del isotipo de inmunoglobulina conocido como Nuevo Receptor de Antígeno (NAR) encontrado en el suero de tiburón. Los procedimientos para producir moléculas de dominio único derivadas de una región variable de NAR ("IgNARs") se describen en el documento WO 03/014161 y Streltso (2005) Protein Sci. 14: 2901-2909.

[0242] Según otro aspecto, una molécula de SDAB es una molécula de unión a antígeno de dominio único de origen natural conocida como una cadena pesada desprovista de las cadenas ligeras. Tales moléculas de dominio único se describen en WO 9404678 y Hamers-Casterman, C. et al. (1993) Nature 363: 446-448, por ejemplo. Por razones de claridad, este dominio variable derivado de una molécula de cadena pesada desprovista de forma natural de cadena ligera se conoce en el presente documento como un VHH o nanoanticuerpo para distinguirla de la VH convencional de inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Dicha molécula de VHH puede derivar de especies de *Camelidae*, por ejemplo en camello, llama, dromedario, alpaca y guanaco. Otras especies además de Camelidae pueden producir moléculas de cadena pesada desprovista de forma natural de cadena ligera; dichos VHH están dentro del alcance de la invención.

[0243] Las proteínas de anticuerpo obtenidas de miembros de la familia de camello y dromedario (Camelus bactrianus y Calelus dromaderius), incluyendo miembros del nuevo mundo, tales como especies de llama (Lama paccos, Lama glama y Lama vicugna) se han caracterizado con respecto al tamaño, complejidad estructural y antigenicidad para los sujetos humanos. Ciertos anticuerpos IgG a partir de esta familia de mamíferos tal como se encuentran en la naturaleza carecen de cadenas ligeras, y por tanto son estructuralmente distintos de la estructura cuaternaria de cuatro cadenas típica que tiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, para los anticuerpos de otros animales. Véase el documento PCT/EP93/02214 (WO 94/04678 publicada el 3 de marzo de 1994).

[0244] Una región del anticuerpo de camélido que es el dominio variable pequeño único identificado como VHH

puede obtenerse por ingeniería genética para producir una proteína pequeña que tiene una alta afinidad por una diana, lo que resulta en una proteína derivada de anticuerpo de bajo peso molecular conocido como "nanoanticuerpo de camélido". Ver la patente de Estados Unidos No. 5.759.808 concedida el 2 de junio de 1998; véase también Stijlemans et al, (2004) J Biol Chem 279: 1256-1261; Dumoulin et al, (2003) Nature 424: 783-788; Pleschberger et al, (2003) Bioconjugate Chem. 14: 440-448; Cortez-Retamozo et al, (2002) Int J Cancer 89: 456-62; y Lauwereys et al, (1998) EMBO J. 17: 3512-3520. Bibliotecas diseñadas de anticuerpos de camélidos y fragmentos de anticuerpos están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Ablynx, Gante, Bélgica (por ejemplo, US20060115470; Domantis (US20070065440, US20090148434) Como con otros anticuerpos de origen no humano, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de camélido puede ser alterada de forma recombinante para obtener una secuencia que se asemeja más a una secuencia humana, es decir, el nanocuerpo puede ser "humanizado". Así, la baja antigenicidad natural de anticuerpos de camélidos a los seres humanos puede reducirse aún más.

[0245] El nanoanticuerpo de camélido tiene un peso molecular de aproximadamente una décima parte de la de una molécula de IgG humana, y la proteína tiene un diámetro físico de sólo unos pocos nanómetros. Una consecuencia del pequeño tamaño es la capacidad de los nanoanticuerpos de camélidos de unirse a sitios antigénicos que son funcionalmente invisibles a proteínas de anticuerpo más grandes, es decir, los nanoanticuerpos de camélidos son útiles como reactivos que detectan antígenos que, de otra manera, son crípticos utilizando técnicas inmunológicas clásicas, y como posibles agentes terapéuticos. Por lo tanto, aún otra consecuencia del pequeño tamaño es que un nanoanticuerpo de camélido puede inhibir, como resultado de la unión a un sitio específico, en una ranura o hendidura estrecha de una proteína diana, y por lo tanto puede servir en una capacidad que se asemeja más a la función de un fármaco de bajo peso molecular clásico que la de un anticuerpo clásico.

[0246] El peso molecular bajo y un tamaño compacto dan lugar además a nanoanticuerpos de camélidos extremadamente termoestables, estables a pH extremo y a la digestión proteolítica, y poco antigénicos. Otra consecuencia es que los nanoanticuerpos de camélidos se mueven fácilmente desde el sistema circulatorio en los tejidos, e incluso atraviesan la barrera hematoencefálica y pueden tratar los trastornos que afectan al tejido nervioso. Los nanoanticuerpos pueden facilitar adicionalmente el transporte del fármaco a través de la barrera hematoencefálica. Véase la solicitud de patente de Estados Unidos 20040161738 publicada el 19 de agosto de 2004. Estas características combinadas con la baja antigenicidad para los seres humanos indican un gran potencial terapéutico. Además, estas moléculas pueden expresarse plenamente en células procariotas tales como E. coli y se expresan como proteínas de fusión con bacteriófago y son funcionales.

[**0247]** Un dominio de unión a antígeno puede comprender un anticuerpo o nanoanticuerpo de camélido, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Tales anticuerpos pueden tener una alta afinidad por su antígeno afín. En ciertas realizaciones en el presente documento, el anticuerpo o nanoanticuerpo de camélido se produce de forma natural en el animal camélido, es decir, se produce por el camélido después de la inmunización con el antígeno o un fragmento de péptido del mismo. Alternativamente, el nanoanticuerpo de camélido está diseñado, es decir, producido mediante selección, por ejemplo, de una biblioteca de fagos que expresan proteínas de anticuerpos de camélidos apropiadamente mutagenizadas utilizando procedimientos de selección con el antígeno diana. Los nanocuerpos diseñados se pueden personalizar adicionalmente mediante ingeniería genética para tener una vida media en un sujeto receptor de 45 minutos a dos semanas. En un ejemplo específico, el anticuerpo o nanoanticuerpo de camélido se obtiene mediante el injerto de las secuencias de CDR de la cadena pesada o ligera de los anticuerpos humanos de la descripción en nanoanticuerpo o secuencias estructurales de anticuerpos de dominio único, tal como se describe por ejemplo en el documento WO94/04678.

[0248] Un dominio de unión a antígeno puede comprender un anticuerpo de dominio único, por ejemplo, que se basa sólo en una región variable de cadena pesada para la unión, por ejemplo, de un nanocuerpo. Los nanoanticuerpos adecuados para uso en el presente documento se pueden preparar mediante los procedimientos descritos en US2010/0028341, WO2009/030285, y WO2010/007376.

[0249] En ciertas realizaciones, la molécula de sdAb es un polipéptido de fusión de cadena única que comprende uno o más moléculas de dominio único (por ejemplo, nanocuerpos), carentes de un dominio variable complementario o una constante de inmunoglobulina, por ejemplo, Fc, región, que se une a uno o más antígenos diana.

[0250] Las moléculas de sdAb pueden ser recombinantes, injertadas con CDR, humanizadas, camelizadas, desinmunizadas y/o generadas in vitro (por ejemplo, seleccionadas mediante expresión en fagos).

[0251] En una realización, la parte del dominio de unió a antígeno comprende un anticuerpo humano o un fragmento del mismo.

[0252] En algunas realizaciones, un anticuerpo no humano está humanizado, donde las secuencias o regiones del anticuerpo específico se modifican para aumentar la similitud con un anticuerpo producido de manera natural en un ser humano. En una realización, el dominio de unión a antígeno está humanizado.

[0253] Los anticuerpos no humanos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, injerto de CDR (véase, por ejemplo, la Patente Europea Nº EP 239400; Publicación

Internacional No. WO 91/09967; y la Patente de Estados Unidos Nº. 5.225.539, 5.530.101, y 5.585.089), el recubrimiento o “resurfacing” (véase, por ejemplo, Patente Europea EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28 (4/5.): 489-498; Studnicka et al, 1994, Protein Engineering, 7 (6): 805-814; y Roguska et al, 1994, PNAS, 91: 969-973), intercambio de cadenas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 5.565.332), y técnicas descritas en, por ejemplo, la publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº US2005/0042664, la publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº US2005/0048617, la patente de los Estados Unidos. No. 6.407.213, la patente de los Estados Unidos. No. 5.766.886, la Publicación Internacional No. WO 9317105, Tan et al, 2002, J. Immunol., 169: 1119-1125; Caldas et al, 2000, Protein Eng, 13 (5): 353-60; Morea et al, 2000, Methods, 20: 267-79; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem, 272: 10678-84; Roguska et al, 1996, Protein Eng, 9 (10): 895-904; Couto et al, 1995, Cancer Res., 55: 5973s-5977; Couto et al, 1995, Cancer Res, 55 (8): 1717-1722; Sandhu 1994 Gene, 150 (2): 409-10; y Pedersen et al., 1994, J. Mol. Biol, 235 (3): 959-73. A menudo, los residuos de la estructura en las regiones estructurales serán sustituidos por el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, por ejemplo, mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el modelado de las interacciones de los residuos de CDR y estructurales para identificar los residuos estructurales importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos estructurales inusuales en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, Queen et al, Patente de Estados Unidos No. 5.585.089; y Riechmann et al, 1988, Nature, 332: 323). En realizaciones preferidas, la molécula de anticuerpo humanizado comprende una secuencia descrita en el presente documento, por ejemplo, una cadena ligera variable y/o una cadena pesada variable descritas en el presente documento, por ejemplo, una cadena ligera variable humanizada y/o cadena pesada variable descritas en la Tabla X.

[0254] Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se refieren a menudo como residuos "importados", que típicamente se toman de un dominio variable "importado". Por lo tanto, los anticuerpos humanizados comprenden una o más CDR de las moléculas de inmunoglobulina no humana y regiones estructurales de ser humano. La humanización de anticuerpos es bien conocida en la técnica y, esencialmente, se puede realizar siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones et al, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al, Science, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de CDRs o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano, es decir, injerto de CDR (EP 239.400; PCT publicación nº WO 91/09967; y la patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; 6.331.415; 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 6.548.640). En tales anticuerpos quiméricos humanizados, sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos estructurales (FR) están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. La humanización de anticuerpos también se puede lograr mediante el recubrimiento o “resurfacing” (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28 (4/5): 489-498; Studnicka et al, Protein Engineering, 7 (6): 805-814 (1994); y Roguska et al, PNAS, 91: 969-973 (1994)) o intercambio de cadenas (patente de Estados Unidos No. 5.565.332).

[0255] En algunos casos, el anticuerpo de la descripción que se prepara adicionalmente usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias de VL y/o VH descritas en el presente documento se puede utilizar como material de partida para diseñar un anticuerpo modificado, cuyo anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas en comparación con el anticuerpo de partida. En diversas realizaciones, el anticuerpo se diseña mediante la modificación de uno o más aminoácidos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, VH y/o VL), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones estructurales.

[0256] En otro aspecto, el dominio de unión a antígeno es un receptor de células T ("TCR"), o un fragmento del mismo, por ejemplo, un TCR de cadena única (scTCR). Los procedimientos para producir tales TCR son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Willemsen RA et al, Gene Therapy 7: 1369-1377 (2000); Zhang T et al, Cancer Gene Ther 11: 487-496 (2004); Aggen et al, Gene Ther. 19 (4): 365-74 (2012). Por ejemplo, los scTCR se pueden diseñar que contienen los genes Vα y Vβ de un clon de células T unidos por un enlazador (por ejemplo, un péptido flexible). Este enfoque es muy útil para diana asociada a cáncer que en sí es intracelular, sin embargo, un fragmento de dicho antígeno (péptido) se presenta en la superficie de las células cancerosas por MHC.

[0257] Un dominio de unión a antígeno puede comprender una secuencia de la Tabla 2.

Tabla 2: Ejemplos de secuencias para dominios de unión a antígeno

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CD19	huscFv1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAP RLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC QQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPG LVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGS ETTYYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS	48
CD19	huscFv2	Eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliy htsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytf gqgtkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvs gvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdns knqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss	49
CD19	huscFv3	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewig viwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakh yyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatls lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgipar fsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik	50
CD19	huscFv4	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewig viwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakh yyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatls lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgipar fsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik	51

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CD19	huscFv5	Eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliy htsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytf gqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvti skdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtv ss	52
CD19	huscFv6	Eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliy htsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytf gqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvti skdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtv ss	53
CD19	huscFv7	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewig viwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakh yyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhs giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkle ik	54
CD19	huscFv8	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewig viwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakh yyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhs giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkle ik	55
CD19	huscFv9	Eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliy htsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytf gqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvti skdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtv ss	56
CD19	Hu scfv10	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewig viwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakh yyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhs giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkle ik	57
CD19	Hu scFv11	Eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliy htsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytf gqgtkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvs gvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdns knqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss	58
CD19	Hu scFv12	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewig viwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakh yyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatls lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgipar fsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik	59

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CD19	muCTL 019	Diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvklliy htsrlhsgvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytf gggtkleitggggsggggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvs gvslpdygvswirqpprkglewlgviwgsettyynsalksrltiikdns ksqvflkmnslqtddtaiyycakhyyyggsyamdywgqgtsvtvss	60
CD123	Mu1172	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGNTFMHWYQQKP GQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATY YCQQSNEDPPTFGAGTKLELKGGGGSGGGGSGGGSQIQLVQSG PELKKPGETVKISCKASGYIFTNYGMNWVKQAPGKSFKWMGWI NTYTGESTYSADFKGRFAFSLETSASTAYLHINDLKNEDTATYFC ARSGGYDPMDYWGQGTSVTVSS	61
CD123	Mu1176	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKDLAWYQEKPGKTNKL LIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNK YPYTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSSGGGSQVQLQQPGAELVRPG ASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPDQGLEWIGRIDPYDSET HYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGNW DDYWGQGTTLTVSS	62
CD123	huscFv1	Divltqspdslavslgeratincrasesvdnygntfmhwyqqkpgqppkllliyrasnlesgvpdrfs gsgsrtdftltisslqaedvavyycqqsnedpptfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqiql vqsgselkkpgasvkvsckasgyiftnygmnwvrqapgqglewmgwintytgestysadfkgrf vfsldtsvstaylqinalkaedtavyycarsggydpmdywgqgttvtvss	63
CD123	huscFv2	Divltqspdslavslgeratincrasesvdnygntfmhwyqqkpgqppkllliyrasnlesgvpdrfs gsgsrtdftltisslqaedvavyycqqsnedpptfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqiql vqsgaevkkpgasvkvsckasgyiftnygmnwvrqapgqrlewmgwintytgestysadfkgr vtitldtsastaymelsslrsedtavyycarsggydpmdywgqgttvtvss	64
CD123	huscFv3	Eivltqspatlslspgeratlscrasesvdnygntfmhwyqqkpgqaprlliyrasnlesgiparfsgs gsrtdftltisslepedvavyycqqsnedpptfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqiqlv qsgselkkpgasvkvsckasgyiftnygmnwvrqapgqglewmgwintytgestysadfkgrfv fsldtsvstaylqinalkaedtavyycarsggydpmdywgqgttvtvss	65
CD123	huscFv4	Eivltqspatlslspgeratlscrasesvdnygntfmhwyqqkpgqaprlliyrasnlesgiparfsgs gsrtdftltisslepedvavyycqqsnedpptfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqiqlv qsgaevkkpgasvkvsckasgyiftnygmnwvrqapgqrlewmgwintytgestysadfkgrvt itldtsastaymelsslrsedtavyycarsggydpmdywgqgttvtvss	66
CD123	huscFv5	Qiqlvqsgselkkpgasvkvsckasgyiftnygmnwvrqapgqglewmgwintytgestysadf kgrfvfsldtsvstaylqinalkaedtavyycarsggydpmdywgqgttvtvssggggsggggsgg ggsggggsdivltqspdslavslgeratincrasesvdnygntfmhwyqqkpgqppkllliyrasnle sgvpdrfsgsgsrtdftltisslqaedvavyycqqsnedpptfgqgtkleik	67
CD123	huscFv6	Qiqlvqsgselkkpgasvkvsckasgyiftnygmnwvrqapgqglewmgwintytgestysadf kgrfvfsldtsvstaylqinalkaedtavyycarsggydpmdywgqgttvtvssggggsggggsgg ggsggggseivltqspatlslspgeratlscrasesvdnygntfmhwyqqkpgqaprlliyrasnles giparfsgsgsrtdftltisslepedvavyycqqsnedpptfgqgtkleik	68
CD123	huscFv7	Qiqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgyiftnygmnwvrqapgqrlewmgwintytgestysad fkgrvtitldtsastaymelsslrsedtavyycarsggydpmdywgqgttvtvssggggsggggsgg ggsggggsdivltqspdslavslgeratincrasesvdnygntfmhwyqqkpgqppkllliyrasnle sgvpdrfsgsgsrtdftltisslqaedvavyycqqsnedpptfgqgtkleik	69

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CD123	huscFv8	Qiqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgyiftnygmnwvrqapgqrlewmgwintytgestysad fkgrvtitldtsastaymelsslrsedtavyycarsggydpmdywgqgttvtvssggggsggggsgg ggsggggseivltqspatlslspgeratlscrasesvdnygntfmhwyqqkpgqaprlliyrasnles giparfsgsgsrtdftltisslepedvavyycqqsnedpptfgqgtkleik	70
EGFR vIII	huscFv1	Eiqlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendetkygpif qgrvtitadtstntvymelsslrsedtavyycafrggvywgqgttvtvssggggsggggsggggsgg ggsdvvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvskldsgvp drfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkveik	71
EGFR vIII	huscFv2	Dvvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvskldsgvpdrfs gsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkveikggggsggggsggggsggggsei qlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendetkygpifqg rvtitadtstntvymelsslrsedtavyycafrggvywgqgttvtvss	72
EGFR vIII	huscFv3	Eiqlvqsgaevkkpgeslrisckgsgfniedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetkygpif qghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggvywgqgttvtvssggggsggggsggggs ggggsdvvmtqsplslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpgqsprrlislvskldsgv pdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycwqgthfpgtfgggtkveik	73
EGFR vIII	huscFv4	Dvvmtqsplslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpgqsprrlislvskldsgvpdrfsg sgsgtdftlkisrveaedvgvyycwqgthfpgtfgggtkveikggggsggggsggggsggggseiq lvqsgaevkkpgeslrisckgsgfniedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetkygpifqgh vtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggvywgqgttvtvss	74
EGFR vIII	huscFv5	Eiqlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendetkygpif qgrvtitadtstntvymelsslrsedtavyycafrggvywgqgttvtvssggggsggggsggggsgg ggsdvvmtqsplslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpgqsprrlislvskldsgvpdr fsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycwqgthfpgtfgggtkveik	75
EGFR vIII	huscFv6	Eiqlvqsgaevkkpgeslrisckgsgfniedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetkygpif qghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggvywgqgttvtvssggggsggggsggggs ggggsdvvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvskldsg vpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkveik	76
EGFR vIII	huscFv7	Dvvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvskldsgvpdrfs gsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkveikggggsggggsggggsggggsei qlvqsgaevkkpgeslrisckgsgfniedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetkygpifqg hvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggvywgqgttvtvss	77
EGFR vIII	huscFv8	Dvvmtqsplslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpgqsprrlislvskldsgvpdrfsg sgsgtdftlkisrveaedvgvyycwqgthfpgtfgggtkveikggggsggggsggggsggggseiq lvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendetkygpifqgr vtitadtstntvymelsslrsedtavyycafrggvywgqgttvtvss	78
EGFR vIII	Mu310 C	eiqlqqsgaelvkpgasvklsctgsgfniedyyihwvkqrteqglewigridpendetkygpifqgr atitadtssntvylqlssltsedtavyycafrggvywgpgttltvssggggsggggsggggshmdvv mtqspltlsvaigqsasisckssqslldsdgktylnwllqrpgqspkrlislvskldsgvpdrftgsgsgt dftlrisrveaedlgiyycwqgthfpgtfgggtkleik	79

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
mesotelina	ss1	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKAS GYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGL ITPYNGASSYNQKFRGKATLTVDKS SSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGG YDGRGFDYWGQGTTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSDIELT QSPASLAVSLGQRAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPKLLIYR ASNLEAGVPTRFSGSGSKTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSREYPYTFG GGTKLEIKRAA	80
Receptor α de folato	MOv19	SRAAQPAMAQVQLQQSGAELVKPGASVLISCKASGYSFTGYFMNWVKQS HGKSLEWIGRIHPYDGDTFYNQNFKDKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSE DFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELT QSPASLAVSLGQRAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPKLLIYR ASNLEAGVPTRFSGSGSKTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSREYPYTFG GGTKLEIKRAA	81

[0258] En una realización, el dominio de unión a antígeno comprende cualquier anticuerpo, o un fragmento del mismo, por ejemplo, un scFv, conocido en la técnica que reconoce o se une específicamente a cualquiera de los siguientes: BCMA (también conocido como TNFRSF17, Superfamilia de Receptores del Factor de Necrosis Tumoral, miembro 17, o antígeno de maduración de células B), CD33, CLL-1 (también conocido como familia 1 de dominio de similar a lectina de tipo C o CLECL1), claudin-6 (CLDN6) o WT-1 (tumor de Wilms 1). El anticuerpo, o fragmento del mismo, puede ser un anticuerpo murino, humanizado o completamente humano o fragmento del mismo.

[0259] En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno comprende una CDR1 de HC, CDR2 de HC y una CDR3 de HC de cualquiera de las secuencias de aminoácidos del dominio de unión a la cadena pesada enumeradas en la Tabla 2. En realizaciones, el dominio de unión a antígeno comprende además una CDR1 de LC, una CDR2 de LC y CDR3 de una LC. En realizaciones, el dominio de unión a antígeno comprende una CDR1 de LC, una CDR2 de LC y una CDR3 de LC de cualquiera de las secuencias de aminoácidos del dominio de unión a la cadena ligera enumeradas en la Tabla 2.

[0260] En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno comprende una, dos o la totalidad de CDR1 de LC, CDR2 de LC y CDR3 de LC de de cualquiera de las secuencias de aminoácidos del dominio de unión a la cadena ligera enumeradas en la Tabla 2, y una, dos o la totalidad de CDR1 de HC, CDR2 de HC y CDR3 de HC de de cualquiera de las secuencias de aminoácidos del dominio de unión a la cadena pesada enumeradas en la Tabla 2.

[0261] En algunas realizaciones, las CDR se definen de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chothia, o una combinación de los mismos.

[0262] En realizaciones, el orden en el que los dominios VL y VH aparecen en el scFv se variado (es decir, orientación VL-VH o VH-VL), y donde tres o cuatro copias de la subunidad "G4S" (SEQ ID NO: 31), en la que cada subunidad comprende la secuencia GGGGS (SEQ ID NO: 31) (por ejemplo, (G4S)3 (SEQ ID NO: 30) o (G4S)4 (SEQ ID NO: 29)), conectan los dominios variables para crear la totalidad del dominio scFv. Alternativamente, la construcción de CAR puede incluir, por ejemplo, un enlazador que incluye la secuencia GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEC ID NO: 86)

[0263] Las secuencias de ejemplo de varios fragmentos scFv y otros componentes de CAR se proporcionan en el presente documento. Cabe indicar que estos componentes de CAR (por ejemplo, de las SEQ ID NOs 26, 89) sin una secuencia líder (por ejemplo, sin la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3), también se proporcionan en el presente documento.

[0264] En los ejemplos, las secuencias de CAR descritas en el presente documento contienen un cambio de residuo Q/K en el dominio de la señal del dominio coestimulador derivado de la cadena CD3zeta.

[0265] En una realización, la porción del CAR que comprende el dominio de unión a antígeno comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD19. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno

reconoce un CD19 humano. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno del CAR tiene la misma especificidad de unión o similar que el fragmento scFv FMC63 descrito en Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-65 (1997). En una realización, el dominio de unión a antígeno del CAR incluye el fragmento de scFv que se describe en Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-65 (1997). Una molécula de anticuerpo CD19 puede ser, por ejemplo, una molécula de anticuerpo (por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-CD19 humanizado) que se describe en WO2014/153270. El documento WO2014/153270 también describe procedimientos de ensayo de la unión y la eficacia de diversas construcciones de CART.

[0266] En un aspecto, la secuencia de scFv murino parental es la construcción de CAR19 proporcionada en la publicación PCT WO2012/079000 y proporcionada en el presente documento como SEQ ID NO: 60. En una realización, el dominio de unión anti-CD19 es un scFv que se describe en WO2012/079000 y se proporciona en la SEQ ID NO: 60.

[0267] En algunos aspectos, los anticuerpos de la descripción se incorporan en un receptor de antígeno quimérico (CAR). En un aspecto, el CAR comprende la secuencia del polipéptido proporcionada como SEC ID Nº: 12 en la publicación PCT WO2012/079000, y proporcionada en el presente documento como SEQ ID NO: 89, en donde el dominio scFv está sustituido con una o más secuencias seleccionadas de SEQ ID NOS: 48-59. En un aspecto, los dominios scFv de SEQ ID NOS: 48-59 son variantes humanizadas del dominio scFv de SEQ ID NO: 60 que es un fragmento scFv de origen murino que se une específicamente a CD19 humano. La humanización de este scFv de ratón puede ser deseable para el entorno clínico, donde los residuos específicos de ratón pueden inducir una respuesta de antígeno anti-ratón humana (HAMA) en pacientes que reciben tratamiento con CART19, por ejemplo, el tratamiento con las células T transducidas con la construcción de CAR19.

[**0268]** El CAR CD19 proporcionado como SEQ ID NO: 12 en la publicación PCT WO2012/079000 es:

MALPVTALLLPLALLLHAARPdiqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvklliyht
srlhsgvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggtkleitggggsggggsggggsevklqesgpglvapsqsls
vtctvsgvslpdygvswirqpprkglewlgviwgsettyynsalksrltiikdnsksqvflkmnslqtddtaiyycakhyyyggsya

mdywgqgtsvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkll
yifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrk
npqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr (SEQ ID NO: 89)

[0269] En una realización, el dominio de unión a antígeno comprende un anticuerpo anti-CD 19, o fragmento del mismo, por ejemplo, un scFv. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno comprende una cadena pesada variable y una cadena ligera variable que aparece en la Tabla 3. La secuencia enlazadora que une las cadenas pesada variable y ligera variable puede ser cualquiera de las secuencias enlazadoras descritas en el presente documento, o alternativamente, puede ser GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 86).

Tabla 3: Dominio de unión del anticuerpo anti-CD 19

Anticuerpo	Secuencia VH	Secuencia VL
SJ25-C1	QVQLLESGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSY WMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKF KGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYSC ARKTISSVVDFYFDYWGQGTTVT (SEQ ID NO: 82)	ELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVA WYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSG TDFTLTITNVQSKDLADYFYFCQYNRYPYTSGGG TKLEIKRRS (SEQ ID NO: 83)

[**0270**] Según la presente invención, se puede utilizar cualquier CAR CD19, por ejemplo, el de dominio de unión a antígeno de CD19 de cualquier CAR CD19 conocido en la técnica. Por ejemplo, LG-740; CAR CD19 que se describe en la Patente de Estados Unidos. No. 8.399.645; Patente de Estados Unidos. No. 7.446.190; Xu et al., Leuk Lymphoma. 2013 54 (2): 255-260 (2012); Cruz et al, Blood 122 (17): 2965-2973 (2013); Brentjens et al, Blood, 118 (18): 4.817-4.828 (2011); Kochenderfer et al, Blood 116 (20): 4099-102 (2010); Kochenderfer et al, Blood 122 (25): 4129-39 (2013); y 16th Annu Meet Am Soc Gen celular Ther (ASGCT) (15-18 mayo de Salt Lake City) 2013, Abst 10.

[0271] Los antígenos diana a modo de ejemplo que pueden reconcoerse usando las células que expresan CAR, incluyen, pero no se limitan a, CD19, CD123, EGFRvIII, mesotelina, entre otros, tal como se describe en, por ejemplo, los documentos WO 2014/130635, WO 2014/130.657 y WO 2015/090230.

[0272] En una realización, la célula T CAR que se une específicamente a CD19 tiene la designación USAN

TISAGENLECLEUCEL-T. CTL019 se produce mediante una modificación de genes de las células T mediada por la inserción estable a través de la transducción con un vector lentiviral (LV) de replicación deficiente de auto-inactivación, que contiene el transgén CTL019 bajo el control del promotor EF-1 lafa. CTL019 puede ser una mezcla de células T positivas y negativas de transgén que se suminsitran al sujeto en base al porcentaje de las células T positivas de transgén.

[0273] En otras realizaciones, las células que expresan CAR pueden unirse específicamente a CD19 humano, por ejemplo, pueden incluir una molécula de CAR, o un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un dominio de unión a antígeno humanizado) de acuerdo con la Tabla 3 de WO2014/153270.

[0274] En otras realizaciones, las células que expresan CAR pueden unirse específicamente a CD123, por ejemplo, pueden incluir una molécula de CAR (por ejemplo, cualquiera de los CAR1-CAR8), o un dominio de unión a antígeno de acuerdo con las Tablas 1-2 del documento WO 2014/130635.

[0275] En otras realizaciones, las células que expresan CAR pueden unirse específicamente a EGFRvIII, por ejemplo, pueden incluir una molécula de CAR, o un dominio de unión a antígeno de acuerdo con la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11 del documento WO 2014/130657.

[0276] En otras realizaciones, las células que expresan CAR pueden unirse específicamente a mesotelina, por ejemplo, pueden incluir una molécula CAR, o un dominio de unión a antígeno de acuerdo con las Tablas 2-3 del documento WO 2015/090230.

[0277] En una realización, el dominio de unión a antígeno comprende una, dos, tres (por ejemplo, las tres) CDR de la cadena pesada, CDR1 de HC, CDR2 de HC y CDR3 de HC, de un anticuerpo indicado anteriormente, y/o una, dos, tres (por ejemplo, las tres) CDR de la cadena ligera, CDR1 de LC, CDR2 de LC y CDR3de LC, de un anticuerpo indicado anteriormente. En una realización, el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo indicado o descrito anteriormente.

CAR biespecíficos

[0278] En una forma de realización, una molécula de anticuerpo multiespecífico es una molécula de anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico tiene especificidad por no más de dos antígenos. Una molécula de anticuerpo biespecífico se caracteriza por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un primer epítopo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo. En una realización, el primer y segundo epítopos están en el mismo antígeno, por ejemplo, la misma proteína (o subunidad de una proteína multimérica). En una realización el primer y segundo epítopos se solapan. En una realización, el primer y segundo epítopos no se solapan. En una realización, el primer y segundo epítopos están en antígenos diferentes, por ejemplo, diferentes proteínas (o diferentes subunidades de una proteína multimérica). En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tienen especificidad de unión para un primer epítopo y una secuencia de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tienen especificidad de unión para un segundo epítopo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un medio de anticuerpo que tiene especificidad de de unión para un primer epítopo y un medio de anticuerpo tiene especificidad de unión para un segundo epítopo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un medio de anticuerpo, o fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un primer epítopo y un medio de anticuerpo, o fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un scFv, o fragmento del mismo, tiene especificidad de unión para un primer epítopo y un scFv, o fragmento del mismo, tiene especificidad de unión para un segundo epítopo.

[0279] En ciertas realizaciones, la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo multiespecífica (por ejemplo, biespecífica o triespecífica). Los protocolos para la generación de moléculas de anticuerpo biespecíficas o heterodiméricas son conocidos en la técnica; incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, la estrategia de "knob in a hole" descrita en, por ejemplo, US 5.731.168; emparejamiento de Fc por guía electrostática, tal como se describe en, por ejemplo, WO 09/089004, WO 06/106905 y WO 2010/129304; formación de heterodímeros mediante Strand Exchange Engineered Domains (SEED), tal como se describe en, por ejemplo, el documento WO 07/110205; intercambio de brazos Fab, tal como se describe en, por ejemplo, WO 08/119353, WO 2011/131746 y WO 2013/060867; conjugado de anticuerpo doble, por ejemplo, mediante reticulación de anticuerpos para generar una estructura biespecífica usando un reactivo heterobifuncional que tiene un grupo reactivo con amina y un grupo reactivo con sulfhidrilo, tal como se describe en, por ejemplo, US 4.433.059; determinantes de anticuerpos biespecíficos generados por recombinación de medios anticuerpos (pares de cadena ligera o pesada o Fabs) de diferentes anticuerpos a través del ciclo de reducción y oxidación de enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas, tal como se describe en, por ejemplo, US 4.444.878; anticuerpos trifuncionales, por ejemplo, tres fragmentos de Fab' reticulados a través de grupos reactivos a sulfhidrilo, tal como se describe en, por ejemplo, US5273743; proteínas de unión biosintética, por ejemplo, par de scFv reticulados a través de colas C-terminales, preferentemente a través de reticulación química reactiva a disulfuro o amino, tal como se describe en, por ejemplo,

US5534254; anticuerpos bifuncionales, por ejemplo, fragmentos Fab con diferentes especificidades de unión dimerizados a través de cremalleras de leucina (por ejemplo, c-fos y c-jun) que han reemplazado el dominio constante, tal como se describe en, por ejemplo, US5582996; receptores de monovalentes y oligovalentes biespecíficos y oligospecíficos, por ejemplo, regiones VH-CH1 de dos anticuerpos (dos fragmentos Fab) enlazados a través de un espaciador polipeptídico entre la región CH1 de un anticuerpo y la región VH del otro anticuerpo típicamente con cadenas ligeras asociadas, tal como se describe en, por ejemplo, US5591828; conjugados biespecífico ADN-anticuerpo, por ejemplo, reticulación de anticuerpos o fragmentos Fab a través de una pieza de doble cadena de ADN, tal como se describe en, por ejemplo, US5635602; proteínas de fusión biespecíficas, por ejemplo, una construcción de expresión que contiene dos scFv con un enlazador peptídico helicoidal hidrófilo entre ellos y una región constante completa, tal como se describe en, por ejemplo, US5637481; proteínas de unión multivalentes y multiespecíficas, por ejemplo, dímero de polipéptidos que tienen un primer dominio con región de unión de región variable de cadena pesada de Ig, y el segundo dominio con una región de unión de región variable de cadena ligera de IG, denominados generalmente diacuerpos (las estructuras de orden superior también están abarcadas creando moléculas bispecíficas, triespecíficas o tetraespecíficas, tal como se describe en, por ejemplo, US5837242; construcciones de minicuerpos con cadenas VL y VH enlazadas conectadas además con espaciadores de péptidos a una región bisagra y región CH3 de anticuerpo, que pueden dimerizarse para formar moléculas biespecíficas/multivalentes, tal como se describe en, por ejemplo, US5837821; dominios VH y VL enlazado con un enlazador peptídico corto (por ejemplo, 5 o 10 aminoácidos) o sin enlazador en absoluto en ninguna orientación, que puede formar dímeros para formar diacuerpos biespecíficos; trímeros y tetrámeros, tal como se describe en, por ejemplo, US5844094; serie de dominios VH (o dominios VL en miembros de familia) conectados por enlaces peptídicos con grupos reticulables en el extremo C-terminal asociado adicionalmente con dominios VL para formar una serie de FVs (o scFv), tal como se describe en, por ejemplo, US5864019; y polipéptidos de unión de cadena única con un dominio VH y un dominio VL unidos a través de un enlazador peptídico se combinan en estructuras multivalentes a través de una reticulación no covalente o química para formar, por ejemplo, estructuras homobivalentes, heterobivalentes, trivalentes y tetravalentes usando un formato de tipo scFv o diacuerpo, tal como se describe en, por ejemplo, US5869620. Las moléculas multiespecíficas y biespecíficas de ejemplo adicionales y procedimientos de fabricación de las mismas se encuentran, por ejemplo, en US5910573, US5932448, US5959083, US5989830, US6005079, US6239259, US6294353, US6333396, US6476198, US6511663, US6670453, US6743896, US6809185, US6833441, US7129330, US7183076, US7521056, US7527787, US7534866, US7612181, US2002004587A1, US2002076406A1, US2002103345A1, US2003207346A1, US2003211078A1, US2004219643A1, US2004220388A1, US2004242847A1, US2005003403A1, US2005004352A1, US2005069552A1, US2005079170A1, US2005100543A1, US2005136049A1, US2005136051A1, US2005163782A1, US2005266425A1, US2006083747A1, US2006120960A1, US2006204493A1, US2006263367A1, US2007004909A1, US2007087381A1, US2007128150A1, US2007141049A1, US2007154901A1, US2007274985A1, US2008050370A1, US2008069820A1, US2008152645A1, US2008171855A1, US2008241884A1, US2008254512A1, US2008260738A1, US2009130106A1, US2009148905A1, US2009155275A1, US2009162359A1, US2009162360A1, US2009175851A1, US2009175867A1, US2009 232811A1, US2009234105A1, US2009263392A1, US2009274649A1, EP346087A2, WO0006605A2, WO02072635A2, WO04081051A1, WO06020258A2, WO2007044887A2, WO2007095338A2, WO2007137760A2, WO2008119353A1, WO2009021754A2, WO2009068630A1, WO9103493A1, WO9323537A1, WO9409131A1, WO9412625A2, WO9509917A1, WO9637621A2, WO9964460A1.

[0280] Dentro de cada anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, scFv) de una molécula de anticuerpo biespecífico, la VH puede estar aguas arriba o aguas abajo de la VL. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aguas arriba (por ejemplo, scFv) está dispuesto con su VH (VH1) aguas arriba de su VL (VL1) y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aguas abajo (por ejemplo, scFv) está dispuesto con su VL (VL2) aguas arriba de su VH (VH2), de manera que la molécula de anticuerpo biespecífico general tiene la disposición VH1-VL1-VL2-VH2. En otras realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aguas arriba (por ejemplo, scFv) está dispuesto con su VL (VL1) aguas arriba de su VH (VH1) y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aguas abajo (por ejemplo, scFv) está dispuesto con su VH (VH2) aguas arriba de su VL (VL2), de manera que la molécula de anticuerpo biespecífico general tiene la disposición VL1-VH1-VH2-VL2. Opcionalmente, un enlazador está dispuesto entre los dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, scFv), por ejemplo, entre VL1 y VL2 si la construcción está dispuesta como VH1-VL1-VL2-VH2, o entre VH1 y VH2 si la construcción está dispuesta como VL1-VH1-VH2-VL2. El enlazador puede ser un enlazador, tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, un enlazador (Gly4-Ser)n, en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, o 6, preferiblemente 4 (SEQ ID NO: 29). En general, el enlazador entre los dos scFv debe ser suficientemente largo para evitar en desapareamiento entre los dominios de las dos scFv. Opcionalmente, un enlazador está dispuesto entre la VL y VH del primera scFv. Opcionalmente, un enlazador está dispuesto entre la VL y VH del segundo scFv. En construcciones que tienen enlazadores múltiples, cualquiera de dos o más de los enlazadores pueden ser los mismos o diferentes. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un CAR biespecífico comprende VL, VH, y opcionalmente uno o más enlazadores en una disposición tal como se describe en el presente documento.

[0281] En un aspecto, la molécula de anticuerpo biespecífico se caracteriza por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina, por ejemplo, un scFv, que tiene una especificidad de unión para un primer antígeno asociado al cáncer, por ejemplo, comprende un scFv, tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, tal como se describen en la Tabla 2, o comprende las CDR de cadena ligera y/o CDR de cadena pesada de un scFv

descrito en el presente documento, y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo en un antígeno diferente. En algunos aspectos, la segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina tiene especificidad de unión para un antígeno expresado en células de AML. Por ejemplo, la segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina tiene especificidad de unión para CD123. Como otro ejemplo, la segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina tiene especificidad de unión para CD33. Como otro ejemplo, la segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina tiene especificidad de unión para CLL-1. Como otro ejemplo, la segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina tiene especificidad de unión para CD34. Como otro ejemplo, la segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina tiene especificidad de unión para FLT3. Por ejemplo, la segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina tiene especificidad de unión por el receptor beta de folato. En algunos aspectos, la segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina tiene especificidad de unión para un antígeno expresado en células B, por ejemplo, CD19, CD20, CD22 o ROR1.

TCR quimérico

[0282] En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento (por ejemplo, los descritos en la Tabla 2) se pueden injertar en uno o más dominios constantes de una cadena de receptor de células T ("TCR"), por ejemplo, una cadena alfa de TCR o cadena beta de TCR, para crear un TCR quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado a cáncer. Sin estar ligado por la teoría, se cree que los TCR quiméricos mostrarán señal a través del complejo TCR tras la unión a antígeno. Por ejemplo, un scFv tal como se describe en el presente documento, puede ser injertado en el dominio constante, por ejemplo, al menos una parte del dominio constante extracelular, el dominio transmembrana y el dominio citoplásmico, de una cadena de TCR, por ejemplo, la cadena alfa de TCR y/o la cadena beta de TCR. Como otro ejemplo, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo un dominio VL tal como se describe en el presente documento, puede ser injertado en el dominio constante de una cadena alfa del TCR, y un fragmento de anticuerpo, por ejemplo un dominio VH tal como se describe en el presente documento, puede ser injertado en el dominio constante de una cadena beta del TCR (o alternativamente, un dominio VL se pueden injertar en el dominio constante de la cadena beta de TCR y un dominio VH se puede injertar en una cadena alfa TCR). Como otro ejemplo, las CDR de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, por ejemplo, las CDR de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo tal como se describen en la Tabla 3 se pueden injertar en una cadena alfa y/o cadena beta de TCR para crear un TCR quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado a cáncer. Por ejemplo, las CDR de LC descritas en el presente documento se pueden injertar en el dominio variable de una cadena alfa del TCR y las CDR de HC descritas en el presente documento se pueden injertar en el dominio variable de una cadena beta del TCR, o viceversa. Tales TCR quiméricos se pueden producir mediante cualquier procedimiento apropiado (por ejemplo, Willemsen RA et al, Gene Therapy 2000; 7: 1369-1377; Zhang T et al, Cancer Gene Ther 2004; 11: 487-496; Aggen et al, Gene Ther. 2012 Apr; 19 (4): 365-74).

Andamios ("scaffolds") que no son anticuerpos

[0283] En realizaciones, el dominio de unión a antígeno comprende un andamio no anticuerpo, por ejemplo, una fibronectina, anquirina, anticuerpo de dominio, lipocalina, compuesto inmuno-farmacéutico modular pequeño, "maxybody", Proteína A, o Affilin. El andamio no anticuerpo tiene la capacidad de unirse a antígeno diana en una célula. En realizaciones, el dominio de unión a antígeno es un polipéptido o fragmento del mismo de una proteína de origen natural que se expresa en una célula. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno comprende un andamio no anticuerpo. Una amplia variedad de andamios que no son anticuerpos puede ser empleados siempre que el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión que se una específicamente al antígeno diana en una célula diana.

[0284] Los andamios que no son anticuerpos incluyen: fibronectina (Novartis, MA), anquirina (Molecular Partners AG, Zurich, Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd., Cambridge, MA, y Ablynx NV, Zwijnaarde, Bélgica), lipocalina (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), compuestos inmuno-farmacéuticos modulares pequeños (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxybodies (Avidia, Inc., Mountain View, CA), proteína A (Affibody AG, Suecia), y Affilin (gamma-cristalina o ubiquitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania).

[0285] Los andamios de fibronectina se pueden basar en dominio de fibronectina de tipo III (por ejemplo, el décimo módulo del tipo de fibronectina III (dominio ^{10} Fn)). El dominio de fibronectina de tipo III tiene 7 u 8 caenas beta que están distribuidas entre dos láminas beta, que se empaquetan entre sí para formar el núcleo de la proteína y, además, contienen los bucles (análogos a CDR) que conectan las cadenas beta entre sí y están expuestos al disolvente. Hay al menos tres de tales bucles en cada borde del sándwich de láminas beta, en el que el borde es el límite de la proteína perpendicular a la dirección de las cadenas beta (véase el documento US 6.818.418). Debido a esta estructura, este andamio que no son anticuerpos mimetiza las propiedades de unión a antígeno que son similares en naturaleza y afinidad a las de anticuerpos. Estos andamios se pueden utilizar en una aleatorización de bucle y estrategia de barajado in vitro que es similar al proceso de maduración de afinidad de anticuerpos in vivo.

[0286] La tecnología de anquirina se basa en el uso de proteínas con módulos de repetición derivados de anquirina como andamios para soportar regiones variables que pueden ser utilizados para la unión a diferentes

dianas. El módulo de repetición de anquirina es un polipéptido de 33 aminoácidos que consiste en dos alfa-hélices anti-paralelas y un giro β. La unión de las regiones variables está optimizada principalmente mediante el uso de expresión en ribosomas.

[0287] Los avímeros derivan de proteína que contiene dominio A natural, tal como HER3. Estos dominios son utilizados por la naturaleza para las interacciones proteína-proteína y en el ser humano más de 250 proteínas estructuralmente se basan en los dominios A. Los avímeros consisten en un número de diferentes monómeros de "dominios A" (2-10) unidos a través de enlazadores de aminoácidos. Los avímeros pueden ser creados para unirse al antígeno diana utilizando la metodología descrita en, por ejemplo, las solicitudes de patente de Estados Unidos Nº 20040175756.; 20050053973; 20050048512; y 20060008844.

[0288] Los ligandos de afinidad Affibody son proteínas pequeñas y sencillas compuestas de un haz de tres hélices basado en el andamio de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A. La proteína A es una proteína de superficie de la bacteria Staphylococcus aureus. Este dominio andamio consiste en 58 aminoácidos, 13 de los cuales se asignaron al azar para generar bibliotecas Affibody con un gran número de variantes de ligando (Véase, por ejemplo, US 5.831.012). Las moléculas Affibody mimetizan anticuerpos, tienen un peso molecular de 6 kDa, en comparación con el peso molecular de los anticuerpos, que es de 150 kDa. A pesar de su pequeño tamaño, el sitio de unión de moléculas Affibody es similar a la de un anticuerpo.

[0289] Los miméticos de proteínas epítopo (PEM) son moléculas similares a péptidos cílcicos de tamaño medio, (PM 1-2kDa) que imitan estructuras secundarias de proteínas de horquilla beta, la estructura secundaria principal implicada en interacciones proteína-proteína. Los dominios de unión a antígeno, por ejemplo, los que comprenden scFv, anticuerpos de dominio único, o anticuerpos de camélidos, se pueden dirigir a cualquier receptor diana/ligando descritos en el presente documento, por ejemplo, los receptores de PD1, PD-L1 o PD-L2.

[0290] En una realización, el dominio de unión a antígeno comprende el dominio extracelular, o un fragmento de unión a contraligando del mismo, de molécula que se une a un contraligando en la superficie de una célula diana.

[0291] Un dominio de unión a antígeno puede comprender un dominio extracelular de un receptor inhibidor. El acoplamiento con un contraligando de la molécula coinhibidora se redirige en una optimización de la respuesta efectora inmunitaria.

[0292] Un dominio de unión a antígeno puede comprender el dominio extracelular de una molécula coestimuladora, referido como un dominio ECD coestimulador. El acoplamiento con un contraligando de la molécula coestimuladora da lugar a la optimización de la respuesta efectora inmunitaria.

DOMINIO TRANSMEMBRANA

[0293] En los ejemplos, un CAR descrito en el presente documento comprende un dominio transmembrana que se fusiona a una secuencia extracelular, por ejemplo, un elemento de reconocimiento extracelular, que puede comprender un dominio de unión a antígeno, un dominio de unión a contraligando inhibidor, o un dominio ECD coestimulador. En un ejemplo, el dominio transmembrana es uno que de forma natural está asociado con uno de los dominios en el CAR. En un ejemplo, el dominio transmembrana es uno que no está asociado de forma natural con uno de los dominios en el CAR.

[**0294**] Un dominio transmembrana puede incluir uno o más aminoácidos adicionales adyacentes a la región transmembrana, por ejemplo, uno o más aminoácidos asociados con la región extracelular de la proteína de la que se derivó la transmembrana (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región extracelular) y/o uno o más aminoácidos adicionales asociados con la región intracelular de la proteína de la que se deriva la proteína transmembrana (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región intracelular). En un aspecto, el dominio transmembrana es uno que está asociado con uno de los otros dominios del CAR por ejemplo, en una realización, el dominio transmembrana puede ser de la misma proteína de la que deeriva el dominio de señalización, dominio coestimuladora o dominio bisagra. En otro aspecto, el dominio transmembrana no se deriva de la misma proteína de la que deriva cualquier otro dominio del CAR.

[0295] En realizaciones, el dominio transmembrana es uno que reduce al mínimo las interacciones con otros elementos, por ejemplo, otros dominios transmembrana. En algunos casos, el dominio transmembrana minimiza la unión de tales dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana superficial, por ejemplo, para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo de receptor. Ejemplos adecuados se pueden derivar mediante selección o modificación de sustitución de aminoácidos de un dominio transmembrana conocido. En una realización, el dominio transmembrana es capaz de promover la homodimerización con otro CAR en la superficie celular. En un aspecto diferente, la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana puede ser modificada o sustituida a fin de minimizar las interacciones con los dominios de unión de la pareja de unión sin tratar presente en la misma célula que expresa CAR.

[0296] El dominio transmembrana puede comprender una secuencia sintética de origen natural o de origen no

natural. Cuando se produce de forma natural, el dominio transmembrana se puede derivar de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana.

[0297] Las regiones transmembrana adecuados para uso en las moléculas descritas en el presente documento pueden derivarse de uno cualquiera o más de, por ejemplo, la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. En algunas realizaciones, un dominio transmembrana puede incluir al menos la región o regiones transmembrana de, por ejemplo, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 41BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gamma, IL7Rα, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/CBP, NKG2D, y NKG2C. En una realización, el dominio transmembrana se deriva de CD8. En una realización, el dominio transmembrana se deriva de CD28. En un aspecto, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana de la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 42.

[0298] En una realización, una secuencia, por ejemplo, una secuencia bisagra o espaciadora, puede disponerse entre un dominio transmembrana y otra secuencia o dominio al que se fusiona. En realizaciones, se puede emplear también una variedad de bisagras humanas (también conocidas como "espaciadores"), por ejemplo, incluyendo, pero no limitado a, la bisagra de Ig humana (inmunoglobulina). En una realización, la bisagra puede ser una bisagra de Ig (inmunoglobulina) humana (por ejemplo, una bisagra IgG4 una bisagra IgD), un enlazador GS (por ejemplo, un enlazador GS descrito en el presente documento), una bisagra KIR2DS2 o una bisagra CD8a. Opcionalmente, un enlazador corto de oligopéptido o polipéptido, de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y otro dominio, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular o dominio coestimulador, de un CAR. Un doblete glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado. En un aspecto, la bisagra o espaciador es la secuencia de aminoácidos proporcionada como SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 8. En un aspecto, la bisagra o espaciador comprende una bisagra KIR2DS2.

[0299] En una realización, el dominio transmembrana puede ser una secuencia de origen no natural, en cuyo caso puede comprender residuos predominantemente hidrófobos, tales como leucina y valina. En una realización, un triplete de fenilalanina, triptófano y valina se puede encontrar en cada extremo de un dominio transmembrana.

[0300] Opcionalmente, un enlazador corto de oligopéptido o polipéptido, de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y la región citoplásmica del CAR. Un doblete glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado. Por ejemplo, en un aspecto, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 10). En algunas realizaciones, el enlazador es codificado por una secuencia de nucleótidos de GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 11).

DOMINIO DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

[0301] En los ejemplos, un dominio de señalización intracelular produce una señal intracelular cuando un dominio extracelular, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno, a la que se fusiona, se une un contraligando. Los dominios de señalización intracelular pueden incluir dominios de señalización intracelular primarios y dominios coestimuladores de señalización. En un ejemplo, una molécula de CAR puede construirse para la expresión en una célula inmunitaria, por ejemplo, una célula T, tal que la molécula de CAR comprende un dominio, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular primaria, dominio coestimulador de señalización, dominios inhibidores, etc., que se deriva de un polipéptido que se asocia típicamente con la célula inmunitaria. Por ejemplo, un CAR para la expresión en una célula T puede comprender un dominio 4-1BB y un dominio CD3 zeta. En este caso, los dominios 4-1BB y CD3 zeta se derivan de polipéptidos asociados con la célula T. En otra realización, un CAR para la expresión en una célula T puede comprender un dominio CD28 y un dominio CD3 zeta. En otra realización, un CAR para la expresión en una célula T puede comprender un dominio ICOS y un dominio CD3 zeta. En otra realización, un CAR para la expresión en una célula T puede comprender un dominio CD27 y un dominio CD3 zeta. En otro ejemplo, una molécula de CAR puede construirse para la expresión en una célula inmunitaria, por ejemplo, una célula T, tal que la molécula de CAR comprende un dominio que se deriva de un polipéptido que no está normalmente asociado con la célula inmunitaria.

DOMINIO DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR PRIMARIA

[0302] En un caso, un dominio de señalización intracelular primaria produce una señal intracelular cuando un dominio extracelular, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno, al que se fusiona se une a un antígeno afín. El dominio de señalización intracelular primaria deriva de una molécula estimuladora primaria, por ejemplo, comprende la secuencia intracelular de una molécula estimuladora primaria. El dominio de señalización intracelular primaria comprende suficiente secuencia de molécula estimuladora primaria para producir una señal intracelular, por ejemplo, cuando un dominio de unión a antígeno al que se fusiona se une a un antígeno afín.

[0303] Una molécula estimuladora primaria es una molécula, que tras unirse a un ligando afín, media una respuesta efectora inmunitaria, por ejemplo, en la célula en la que se expresa. Típicamente, se genera una señal intracelular que es dependiente de la unión a un ligando afín que comprende antígeno. El complejo TCR/CD3 es una molécula estimuladora primaria de ejemplo; genera una señal intracelular tras la unión a un ligando afín, por ejemplo, una molécula de MHC cargada con un péptido. Típicamente, por ejemplo, en el caso de la molécula estimuladora primaria TCR/CD3, la generación de una señal intracelular por un dominio de señalización intracelular primaria depende de la unión de la molécula estimuladora primaria al antígeno.

[0304] La estimulación primaria puede mediar la expresión alterada de ciertas moléculas, tales como la regulación por descenso de TGF-β y/o la reorganización de las estructuras del citoesqueleto, y similares. La estimulación puede, por ejemplo, en presencia de la coestimulación, dar lugar a una optimización, por ejemplo, un aumento, en una función efectora inmune de la célula CARX, por ejemplo, la célula CART. La estimulación, por ejemplo, en el contexto de una célula CART, puede mediar una respuesta de células T, por ejemplo, proliferación, activación, diferenciación, y similares.

[0305] En una realización, el dominio de señalización intracelular primaria comprende un motivo de señalización, por ejemplo, un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptorra o ITAM. Un dominio de señalización intracelular primaria puede comprender ITAM que contiene secuencias de señalización citoplasmáticas de (por ejemplo) TCR zeta (CD3 zeta), FcR gamma común (FCER1G), FcR beta (Fc épsilon R1b), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (también conocido como "ICOS "), FcεRI, DAP10, DAP12 y CD66d.

[0306] Los ejemplos de dominios de señalización intracelular primaria se proporcionan en la Tabla 4.

Tabla 4 Dominios de Señalización Intracelular Primaria en realizaciones que el dominio comprende un ITAM
TCR zeta
FcR gamma
FcR beta
CD3 gamma
CD3 delta
CD3 epsilon
CD3 zeta
CD5
CD22
CD79a
CD79b
CD66d
DAP10
DAP12
CD32

[0307] Un dominio de señalización intracelular primaria comprende un fragmento funcional o análogo, de una molécula estimuladora primaria (por ejemplo, CD3 zeta -. GenBank Acc No. BAG36664.1) El dominio de señalización intracelular primaria puede comprender toda la región intracelular o un fragmento de la región intracelular que es suficiente para la generación de una señal intracelular cuando un dominio de unión a antígeno al que se fusiona se une a un antígeno afín. En realizaciones, el dominio de señalización intracelular primaria tiene al menos 70, 75. 80. 85, 90, 95, 98, o 99% de identidad de secuencia con la región intracelular entera, o un fragmento de la región intracelular que es suficiente para la generación de una señal intracelular, de una molécula estimuladora primaria de origen natural, por ejemplo, un ser humano (GenBank Acc. No. BAG36664.1), u otra molécula estimuladora de señalización primaria de mamífero, por ejemplo, una especie no humana, por ejemplo, roedores, mono o murina. En realizaciones, el dominio de señalización intracelular primaria tiene al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO: 20.

[0308] En realizaciones, el dominio de señalización intracelular primaria, tiene al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad con, o difiere en no más de 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 residuos de aminoácidos de los residuos correspondientes de la región intracelular entera, o un fragmento de la región intracelular, que es suficiente para la generación de una señal intracelular, de una molécula estimuladora primaria humana de origen natural, una molécula estimuladora primaria humana de origen natural descrita en el presente documento.

DOMINIOS COESTIMULADORES DE SEÑALIZACIÓN

[0309] En un ejemplo, un dominio coestimulador de señalización produce una señal intracelular cuando un dominio extracelular, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno al que se fusiona se une un ligando afín. El dominio coestimulador de señalización se deriva de una molécula coestimuladora. El dominio coestimulador de señalización

comprende suficiente secuencia de molécula coestimuladora primaria para producir una señal intracelular, por ejemplo, cuando un dominio extracelular, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno, al que se fusiona se une un ligando afín.

[0310] El dominio coestimulador puede ser uno que optimiza el rendimiento, por ejemplo, la persistencia o la función efectora inmunitaria, de una célula T que comprende un CAR que comprende el dominio coestimulador. Por ejemplo, un CAR (un CAR^{CD4+}) para uso en células T CD4+ puede comprender un dominio ICOS. Por ejemplo, un CAR (un CAR^{CD8+}) para uso en células T CD8+ puede comprender un CD28 o un dominio 4-1BB.

[0311] Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular, distintas de receptores de antígenos o sus contraligandos, que promueven una respuesta efectora inmune. En algunos casos, se requieren para una respuesta inmunitaria eficaz o mejorada. Típicamente, una molécula coestimuladora genera una señal intracelular que es dependiente de la unión a un ligando afín que es, en algunos casos, distinto de un antígeno, por ejemplo, el antígeno reconocido por un dominio de unión a antígeno de una célula CARX, por ejemplo, una célula CART. Típicamente, la señalización de una molécula estimuladora primaria y una molécula coestimuladora contribuye a una respuesta efectora inmune, y en algunos casos, ambas son necesarias para la generación eficiente o mejorada de una respuesta efectora inmune.

[0312] Un dominio coestimulador comprende un fragmento funcional o análogo, de una molécula coestimuladora (por ejemplo, ICOS, CD28 o 4-1BB). Puede comprender toda la región intracelular o un fragmento de la región intracelular que es suficiente para la generación de una señal intracelular, por ejemplo, cuando un dominio de unión a antígeno al que se fusiona se une a un antígeno afín. En realizaciones, el dominio coestimulador tiene al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, o 99% de identidad de secuencia con toda la región intracelular o un fragmento de la región intracelular que es suficiente para la generación de una señal intracelular de una molécula coestimuladora de origen natural, por ejemplo, humana, u otra molécula coestimuladora intracelular de mamífero, por ejemplo, una especie no humana, por ejemplo, roedores, mono o murina. En realizaciones, el dominio coesitmulador tiene al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 46.

[0313] Los dominios de señalización coestimulador a modo de ejemplo (dominios de señalización intracelular) se proporcionan en la Tabla 5.

Tabla 5: Dominios de señalización coestimuladores para RCARX (identificados por las moléculas coestimuladoras de las que se derivan)
CD27
CD28
4-1BB (CD137)
OX40
CD30
CD40
ICOS (CD278)
ICAM-1
LFA-1 (CD11a/CD18)
CD2
CD7
LIGHT
NKG2C
B7-H3
Un ligando que se une específicamente con CD83
CDS
GITR
BAFFR
HVEM (LIGHTR)
SLAMf7
NKP80 (KLRF1)
CD160 (BY55)
CD19
CD4
CD8 alfa
CD8 beta
ILR2 beta
ILR2 gamma
ILR7 alfa
ITGA4

VLA1
CD49a
ITGA4
IA4
CD49D
ITGA6
VLA-6
C49f
ITGAD
CD11d
ITGAE
CD103
ITGAL
CD11a
LFA-1
ITGAM
CD11b
ITGAX
CD11c
ITGB1
CD29
ITGB2
CD18
ITGB7
TNFR2
TRANCE/RANKL
DNAM1 (CD226)
SLAMF4 (C244, 2B4)
CD84
CD96 (Táctil)
CEACAM1
CRTAM
Ly8 (CD229)
PSGL1
C100 (SEMA4D)
CD69
SLAMF6 (NTB-A, Ly108)
SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3)
BLAME (SLAMF8)
SELPLG (CD162)
LTBR
LAT
GADS
PAG/Cbp

[0314] En realizaciones, el dominio de señalización coestimulador, tiene al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad con, o difiere en no más de 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 residuos de aminoácidos de los residuos correspondientes de toda la región intracelular o un fragmento de la región intracelular que es suficiente para la generación de una señal intracelular de una molécula coestimuladora humana de origen natural, por ejemplo, una molécula coestimuladora humana de origen natural descrita en el presente documento.

MOLÉCULAS INHIBIDORAS: INHIBICIÓN

[0315] Las moléculas inhibidoras, por ejemplo, PD1, pueden, en algunos casos, disminuir la capacidad de una célula CARX de montar una respuesta efectora inmunitaria. La inhibición de una molécula inhibidora, por ejemplo, mediante la inhibición a nivel de ADN, ARN o proteína, puede optimizar el rendimiento de la célula CARX. En ejemplos, un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo, un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo, un dsARN, por ejemplo, un siARN o shRNA, se puede utilizar para inhibir la expresión de una molécula inhibidora en la célula CARX. En un ejemplo, el inhibidor es un shRNA. En un ejemplo, la molécula inhibidora es inhibida dentro de una célula CARX. En estos casos, una molécula de dsARN que inhibe la expresión de la molécula inhibidora está unida con el ácido nucleico que codifica un componente, por ejemplo, todos los componentes, del CAR.

[0316] Las moléculas inhibidoras de ejemplo útiles, por ejemplo, como dianas de ARNhc, se proporcionan en la Tabla 6.

Tabla 6: Moléculas inhibidoras
CD160
2B4
PD1
TIM3
LAG3
TIGIT
CTLA-4
BTLA
LAIR1
PD-L1
VISTA

[0317] En otro aspecto, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede expresar además otro agente, por ejemplo, un agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, en un ejemplo, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Las moléculas inhibidoras, por ejemplo, PD1, pueden, en algunos casos, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR de montar una respuesta efectora inmunitaria. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, Gal9, adenosina, y TGFR beta. En un ejemplo, el agente que inhibe una molécula inhibidora, por ejemplo, es una molécula descrita en el presente documento, por ejemplo, un agente que comprende un primer polipéptido, por ejemplo, una molécula inhibidora, asociada con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento. En un ejemplo, el agente comprende un primer polipéptido, por ejemplo, de una molécula inhibidora, tal como PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC clase II, Gal9, adenosina, y TGFR beta, o un fragmento de cualquiera de éstos (por ejemplo, al menos una parte de un dominio extracelular de cualquiera de éstos), y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo, que comprende un dominio coestimulador (por ejemplo, 4-1BB, ICOS, CD27 o CD28, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento) y/o un dominio de señalización primaria (por ejemplo, un dominio de señalización CD3 zeta descrito en el presente documento). En un ejemplo, el agente comprende un primer polipéptido de PD1 o un fragmento del mismo (por ejemplo, al menos una parte de un dominio extracelular de PD1), y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo, un dominio de señalización CD28 descrito en el presente documento y/o un dominio de señalización CD3 zeta descrito en el presente documento). En los ejemplos, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento comprende un receptor coestimulador interruptor, por ejemplo, como se describe en el documento WO 2013/019615. PD1 es un miembro de inhibidor de la familia de receptores CD28, que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS, y BTLA. PD-1 se expresa en células B activadas, células T y células mieloides (Agata et al 1996 Int Immunol. 8: 765-75). Dos ligandos para PD1, PD-L1 y PD-L2, han demostrado regular por disminución la activación de células T tras la unión a PD1 (Freeman et un 2000 J Exp Med 192: 1027-1034; Latchman et al 2001 Nat Immunol. 2: 261-8; Carter et al 2002 Eur J Immunol 32: 634-43). PD-L1 es abundante en cánceres humanos (Dong et al 2003 J Mol Med 81: 281-7; Blank et al 2005 Cancer Immunol Immunother 54: 307-314; Konishi et al 2004 Clin Cancer Res. 10: 5094). La supresión inmunitaria puede invertirse mediante la inhibición de la interacción local de PD1 con PD-L1.

RECEPTORES INHIBIDORES CONMUTABLES REDIRIGIDOS: DOMINIOS EXTRACELULARES INHIBIDORES

[0318] Los dominios extracelulares de receptores inhibidores pueden acoplarse a los dominios de señalización intracelular que promueven una respuesta efectora inmunitaria. Por lo tanto, el acoplamiento con un contraligando de la molécula coinhibidora se redirige en una optimización de la respuesta efectora inmunitaria.

[0319] En un ejemplo, el CAR que comprende un dominio extracelular (ECD) de una molécula inhibidora es un CAR^{CD4+}, por ejemplo, que comprende un dominio ICOS y está dispuesto en una célula T CD4+. En una realización, el CAR que comprende un dominio extracelular (ECD) de una molécula inhibidora es un CAR^{CDI+}, por ejemplo, que comprende un dominio CD28 o 4-1BB, y está dispuesta en una célula T CD8+.

[0320] En un ejemplo, el dominio extracelular (ECD) de una molécula inhibidora, por ejemplo, una molécula inhibidora descrita en el presente documento, tal como, por ejemplo, muerte programada 1 (PD1), puede fusionarse con un dominio transmembrana y dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio coestimulador de señalización, tal como, por ejemplo, 41BB OX40, CD28, CD27, ICOS, y/o un dominio de señalización primaria, por ejemplo, de CD3 zeta. En un ejemplo, la molécula inhibidora CAR, por ejemplo, PD1 CAR, puede utilizarse sola. En un ejemplo, la molécula inhibidora CAR, por ejemplo, la molécula inhibidora CAR, por ejemplo, PD1 CAR, puede utilizarse en

combinación con otro CAR, por ejemplo, CD19CAR (por ejemplo, un CD19CAR). En un ejemplo, el PD1 CAR mejora la persistencia de la célula T. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC clase II, Gal9, adenosina y TGFR beta. En un ejemplo, la molécula inhibidora CAR comprende un primer polipéptido, por ejemplo, de una molécula inhibidora, tal como PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM -5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR , MHC de clase I, MHC clase II, Gal9, adenosina, y TGFR beta, o un fragmento de cualquiera de éstos (por ejemplo, al menos una parte de un dominio extracelular de cualquiera de éstos), y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo, que comprende un dominio coestimulador (por ejemplo, 41BB, ICOS, CD27 o CD28, por ejemplo, como se describe en el presente documento) y/o un dominio de señalización primaria (por ejemplo, un dominio de señalización CD3 zeta descrito en el presente documento).

[0321] En un ejemplo, la molécula inhibidora de CAR comprende el dominio extracelular (ECD) de PD1 fusionado a un dominio transmembrana y dominios de señalización intracelulares, tales como 41BB y CD3 zeta (también denominados en el presente documento como PD1 CAR). En un ejemplo, el PD1 CAR mejora la persistencia de la célula que expresa CAR. En un ejemplo, el PD1 CAR comprende el dominio extracelular de PD1; la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de PD1 se proporciona como SEQ ID NO: 24.

[0322] En un ejemplo, el PD1 CAR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 o 39.

[0323] En un ejemplo, el PD1 CAR, por ejemplo, el PD1 CAR descrito en el presente documento, está codificado por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 27, o al menos comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 25 que codifica el dominio extracelular de PD-1.

[0324] Los ejemplos de dominios extracelulares inhibidores se proporcionan en la Tabla 7.

Tabla 7: Dominios de unión a contraligando extracelulares de moléculas coinhibidoras (identificados por las moléculas coinhibidoras de las que derivan)
B7-H1
B7-1
CD160
P1H
2B4
PD1
TIM3
LAG3
TIGIT
CTLA-4
BTLA
LAIR1
Receptor de TGF-beta

[0325] En algunos casos, el dominio extracelular inhibidor, tiene al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad con, o difiere en no más de 30, 25, 20, 15 , 10, 5, 4, 3, 2, o 1 residuos de aminoácidos de los residuos correspondientes de toda la región extracelular, o un fragmento de la región extracelular que es suficiente para el acoplamiento con el contraligando, de una molécula inhibidora humano de origen natural, por ejemplo, una molécula estimuladora primaria humana de origen natural descrita en el presente documento.

DOMINIOS DE UNIÓN A LIGANDO DE MOLÉCULA COESTIMULADORA

[0326] Los dominios de unión a ligando extracelulares de moléculas coestimuladoras, referidos como un dominio ECD coestimuladoro, pueden acoplarse a dominios de señalización intracelular que promueven una respuesta efectora inmunitaria. Por lo tanto, el acoplamiento con un contraligando de la molécula coestimuladora da lugar a la optimización de la respuesta efectora inmunitaria.

[0327] En un caso, el CAR que comprende un dominio ECD coestimulador es un CAR^{CD4+}, que comprende, por ejemplo, un dominio ICOS, y está dispuesto en una célula T CD4+. En una realización, el CAR que comprende un dominio ECD coestimulador es un CAR^{CD8+}, que comprende, por ejemplo, un dominio CD28 o 4-1BB, y está dispuesto en una célula T CD8+.

[0328] Los dominios ECD coestimuladores de ejemplo se proporcionan en la Tabla 8

Tabla 8: Dominios ECD coestimuladores de moléculas coestimuladoras (identificados por las moléculas

coestimuladoras de las que derivan)
ICOS
CD28
CD27
HVEM
LIGHT
CD40L
4-1BB
OX40
DR3
GITR
CD30
TIM1
SLAM
CD2
CD226

[0329] En realizaciones, el dominio ECD coestimulador tiene al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad con, o difiere en no más de 30, 25, 20, 15 , 10, 5, 4, 3, 2, o 1 residuos de aminoácidos de los residuos correspondientes de toda la región extracelular, o un fragmento de la región extracelular que es suficiente para el acoplamiento con el contraligando, de una molécula inhibidora humana de origen natural, por ejemplo, una molécula coestimuladora humana de origen natural descrita en el presente documento.

ICAR

[0330] Los CAR descritos en el presente documento pueden incluir un miembro de CAR inhibidor (ICAR).Un miembro iCAR comprende: un dominio de unión al antígeno (u otro dominio extracelular) que reconoce un antígeno en una célula no diana, por ejemplo, una célula no cancerosa; un dominio transmembrana; y, un dominio de una molécula inhibidora, por ejemplo, un dominio intracelular de una molécula inhibidora, por ejemplo, de PD-1, CTLA4, o de una proteína que aparece en la Tabla 9. En un ejemplo, el miembro de iCAR comprende un segundo dominio de señalización intracelular inhibido, por ejemplo, de PD-1, CTLA4, o de una proteína que aparece en la Tabla 9.

[0331] Tras el acoplamiento del dominio de unión a antígeno (u otro dominio extracelular) del miembro de iCAR con su antígeno diana (o contraligando), el iCAR contribuye a la inhibición, por ejemplo, la inhibición de forma reversible, o reducción al mínimo, de la activación de la célula que comprende iCAR. Como tal, la inclusión de un miembro de iCAR en un CAR, por ejemplo, y célula CART, puede limitar los daños a células no diana, por ejemplo, células espectadoras. Si bien no se desea estar ligado por la teoría, se cree que un miembro de iCAR, tras el acoplamiento con su antígeno (o contraligando), limita una o más de la secreción de citocinas, la citotoxicidad y la proliferación. En casos, el efecto es temporal, y tras el acoplamiento posterior con una célula diana, el CAR, por ejemplo, célula CART, se activa y ataca la célula diana.

[0332] Un antígeno diana para un miembro iCAR puede ser un antígeno que tiene un perfil de expresión en las células diana y las células no diana de tal manera que se consigue un nivel de ataque en las células diana aceptablemente alto y un nivel de ataque aceptablemente bajo a las células no diana. No sólo la elección de antígeno, sino la afinidad de iCAR por su antígeno (o contraligando), la afinidad de CAR por su antígeno, el nivel de expresión de iCAR, o los niveles de expresión dell CAR se pueden utilizar para optimizar la relación de respuesta en diana/fuera de diana.

[0333] En un ejemplo, el antígeno está ausente, o regulado por disminución en las células tumorales. En un ejemplo, el antígeno comprende una molécula HLA. En un ejemplo, el antígeno comprende un antígeno de supresión de tumor de la superficie celular. En un ejemplo, el antígeno comprende PCML (u otro antígeno que es el regulado por disminución en los linfomas, cáncer de mama o de próstata), HYAL2, DCC, o SMAR1.

[0334] En un ejemplo, el antígeno comprende una proteína, carbohidrato, lípido, o una modificación post-traduccional de un resto de superficie celular, por ejemplo, un O-glicano de tipo mucina (un núcleo 3 O-glicano).

[0335] En un ejemplo, el antígeno comprende un resto que es regulado por disminución por las células tumorales que experimentan una transición de epitelial a mesenquimal.

[0336] En un ejemplo, el antígeno comprende E-cadherina.

[0337] En un ejemplo, un dominio de una molécula inhibidora, por ejemplo, de un dominio de señalización intracelular de PD-1 o CTLA4, produce una señal intracelular cuando un dominio extracelular, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno, al que se fusiona se une a un antígeno afín (o contraligando). El dominio de señalización intracelular inhibidor se deriva de una molécula inhibidora, por ejemplo, comprende la secuencia

intracelular de una molécula inhibidora. Comprende suficiente secuencia de molécula inhibidora para producir una señal intracelular, por ejemplo, cuando un dominio de unión a antígeno al que está fusionado se une a su antígeno afín.

[0338] En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular primaria comprende un motivo de señalización, por ejemplo, un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora o ITIM.

[0339] Un dominio de una molécula inhibidora comprende un fragmento funcional o análogo, de un dominio intracelular de molécula inhibidora. Puede comprender toda la región intracelular o un fragmento de la región intracelular que es suficiente para la generación de una señal intracelular cuando un dominio de unión a antígeno al que se fusiona se une a un antígeno afín. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular inhibidor tiene al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, o 99% de identidad de secuencia con, o difiere en no más de 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 residuos de aminoácidos de, los residuos correspondientes de una molécula inhibidora de origen natural, por ejemplo, una molécula de la Tabla 9.

[0340] Las moléculas inhibidoras de ejemplo que pueden proporcionar dominios de señalización intracelulares se proporcionan en la Tabla 9.

Tabla 9: Moléculas inhibidoras
B7-H1
B7-1
CD160
P1H
2B4
PD1
TIM3
LAG3
TIGIT
CTLA-4
BTLA
LAIR1
Receptor de TGF-beta

[0341] De este modo, en un aspecto, que se describe en el presente documento, un CAR que comprende un miembro iCAR. El miembro iCAR comprende:
un dominio de unión al antígeno (u otro dominio extracelular) que reconoce un antígeno en una célula no diana, por ejemplo, una célula no cancerosa;
un dominio transmembrana; y
un dominio de una molécula inhibidora, por ejemplo, de PD-1, CTLA4, o de una proteína indicada en la Tabla 4.

[0342] En un ejemplo, el miembro iCAR comprende un segundo dominio de señalización intracelular inhibidor, por ejemplo, de PD-1, CTLA4, o de una proteína indicada en la Tabla 9.

CAR DE RECEPTORES DE CÉLULAS ASESINAS NATURALES (NKR)

[0343] En un ejemplo, una molécula de CAR descrita en el presente documento comprende uno o más componentes de un receptor de células asesinas naturales (NKR), formando de este modo un NKR-CAR. El componente NKR puede ser un dominio transmembrana, un dominio bisagra o un dominio citoplásmico de cualquiera de los siguientes receptores de células asesinas naturales: receprtor similar a inmunoglobulina de células asesinas (KIR), por ejemplo, KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, DIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1 y KIR3DP1; receptor de citotoxicidad natural (NCR), por ejemplo, NKp30, NKp44, NKp46; familia de moléculas de activación de linfocitos de señalización (SLAM) de receptores de las células inmunitarias, por ejemplo, CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME y CD2F-10; Receptor Fc (FcR), por ejemplo, CD16, y CD64; y receptores Ly49, por ejemplo, Ly49A, Ly49C. Las moléculas NKR-CAR descritas en el presente documento pueden interactuar con una molécula adaptadora o dominio de señalización intracelular, por ejemplo, DAP12. Las configuraciones a modo de ejemplo y las secuencias de moléculas CAR que comprenden componentes NKR se describen en la Publicación Internacional Nº WO2014/145252.

ESTRATEGIAS PARA LA REGULACIÓN DE RECEPTORES DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS

[0344] Hay muchas formas para regular las actividades de CAR. En algunas realizaciones, es deseable un CAR regulable (RCAR) donde la actividad de CAR puede ser controlada, para optimizar la seguridad y la eficacia de una terapia con CAR. Por ejemplo, la inducción de apoptosis usando, por ejemplo, una caspasa fusionada a un dominio de dimerización (véase, por ejemplo, Di et al, N Engl J. Med 2011 Nov. 3; 365 (18): 1673 a 1683), puede utilizarse

como un interruptor de seguridad en la terapia con CAR de la presente invención. En otro ejemplo, las células que expresan CAR también pueden expresar una molécula de caspasa-9 inducible (iCaspasa-9) que, tras la administración de un fármaco dimerizador (por ejemplo, rimiducid (también llamado AP1903 (Bellicum Pharmaceuticals) o AP20187 (Ariad)) conduce a la activación de la caspasa-9 y la apoptosis de las células. La molécula iCaspasa-9 contiene un dominio de unión a un inductor químico de dimerización (CID) que media la dimerización en presencia de un CID. Esto da lugar al agotamiento inducible y selectivo de las células que expresan CAR. En algunos casos, la molécula de iCaspasa-9 es codificada por una molécula de ácido nucleico separada del vector o vectores que codifican CAR. En algunos casos, la molécula de iCaspasa-9 es codificada por la misma molécula de ácido nucleico que el vector que codifica CAR. La iCaspasa-9 puede proporcionar un interruptor de seguridad para evitar cualquier toxicidad de células que expresan CAR Véase, por ejemplo, Song et al Cancer gene Ther 2008; 15 (10): 667-75; Clinical Trial Id No. NCT02107963; y Di Stasi et al N. Engl J. Med 2011; 365: 1673-1683.

[0345] Las estrategias alternativas para regular la terapia con CAR de la presente invención incluyen la utilización de moléculas pequeñas o anticuerpos que desactivan o desconectan la actividad de CAR, por ejemplo, mediante la supresión de células que expresan CAR, por ejemplo, mediante la inducción de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en el presente documento también pueden expresar un antígeno que es reconocido por moléculas capaces de inducir la muerte celular, por ejemplo, ADCC o la muerte celular inducida por complemento. Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en el presente documento también pueden expresar un receptor capaz de ser reconocido por un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Ejemplos de tales receptores incluyen EpCAM, VEGFR, integrinas (por ejemplo, integrinas αvβ3, α4, αI3/4β3, α4β7, α5β1, αvβ3, αv), los miembros de la superfamilia de receptores de TNF (por ejemplo, TRAIL-R1, TRAIL-R2), receptor de PDGF, receptor de interferón, receptor de folato, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, receptor de IL-6, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD11, CD11 a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/receptor de IgE, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80 , CD125, CD147/basigina, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7, y EGFR, y versiones truncadas de los mismos (por ejemplo, versiones que conservan uno o más epítopos extracelulares pero que carecen de una o más regiones dentro del dominio citoplásmico). Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en el presente documento también pueden expresar un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) truncado, que carece de la capacidad de señalización, pero conserva el epítopo que es reconocido por moléculas capaces de inducir ADCC, por ejemplo, cetuximab (Erbitux®), tal que la administración de cetuximab induce ADCC y el subsiguiente agotamiento de las células que expresan CAR (véase, por ejemplo, WO2011/056894, y Jonnalagadda et al, gene Ther 2013; 20 (8) 853-860). Otra estrategia incluye la expresión de un gen marcador/suicida altamente compacto que combina epítopos diaan de ambos antígenos CD32 y CD20 en las células que expresan CAR descritas en el presente documento, que se une rituximab, lo que resulta en el agotamiento selectivo de las células que expresan CAR, por ejemplo, mediante ADCC (véase, por ejemplo, Philip et al, Blood 2014; 124 (8) 1277-1287). Otros procedimientos para el agotamiento de células que expresan CAR descritas en el presente documento incluyen la administración de Campath®, un anticuerpo monoclonal anti-CD52 que se une selectivamente y reconoce linfocitos maduros, por ejemplo, células que expresan CAR para la destrucción, por ejemplo, mediante la inducción de ADCC. En otros casos, la célula que expresa CAR puede ser reconocida selectivamente usando un ligando de CAR, por ejemplo, un anticuerpo anti-idiotípico. En algunos casos, el anticuerpo anti-idiotípico puede causar la actividad de células efectoras, por ejemplo, actividades ADCC o ADC, reduciendo así el número de células que expresan CAR. En otros casos, el ligando de CAR, por ejemplo, el anticuerpo anti-idiotípico, puede ser acoplado a un agente que induce la muerte celular, por ejemplo, una toxina, lo que reduce el número de células que expresan CAR. En otros casos, las células que expresan CAR pueden ser reconocidas selectivamente usando un ligando de CAR, por ejemplo, un anticuerpo anti-idiotípico. En algunos casos, el anticuerpo anti-idiotípico puede causar la actividad de células efectoras, por ejemplo, actividades ADCC o ADC, reduciendo así el número de células que expresan CAR. En otros casos, el ligando de CAR, por ejemplo, el anticuerpo anti-idiotípico, se puede acoplar a un agente que induce la muerte celular, por ejemplo, una toxina, lo que reduce el número de células que expresan CAR. Alternativamente, las propias moléculas de CAR pueden ser configuradas de tal manera que la actividad puede ser regulada, por ejemplo, conexión y desconexión, tal como se describe a continuación.

[0346] En un aspecto, un RCAR comprende un conjunto de polipéptidos, típicamente dos en los ejemplos más simples, en los que los componentes de un CAR estándar descritos en el presente documento, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno y un dominio de señalización intracelular, se dividen en polipéptidos o miembros separados. En algunos casos, el conjunto de polipéptidos incluyen un interruptor de dimerización que, en presencia de una molécula de dimerización, puede acoplar los polipéptidos uno al otro, por ejemplo, puede acoplar un dominio de unión a antígeno a un dominio de señalización intracelular. En un ejemplo, los CAR de la presente descripción utiliza un interruptor de dimerización tal como los descritos en, por ejemplo, WO2014127261. La descripción adicional y las configuraciones de ejemplo de dichos CAR regulables se proporcionan en el presente documento y en la publicación internacional No. WO 2015/090229.

[0347] En un aspecto, un RCAR comprende dos polipéptidos o miembros: 1) un miembro de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular primaria descrito en el presente documento, y un primer dominio interruptor; 2) un miembro de unión a antígeno que comprende un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, que se une específicamente a CD19, como

se describe en el presente documento y un segundo dominio interruptor. Opcionalmente, el RCAR comprende un dominio transmembrana que se describe en el presente documento. En una realización, un dominio transmembrana puede estar dispuesto en el miembro de señalización intracelular, en el miembro de unión a antígeno, o en ambos. (A menos que se indique lo contrario, cuando los miembros o elementos de un RCAR se describen en el presente documento, el orden puede ser tal como se proporciona, pero otros órdenes están incluidos también. En otras palabras, en una realización, el orden es tal como se establece en el texto, pero en otras realizaciones, el orden puede ser diferente. por ejemplo, el orden de los elementos en un lado de una región transmembrana puede ser diferente del ejemplo, por ejemplo, la colocación de un dominio interruptor con respecto a un dominio de señalización intracelular puede ser diferente, por ejemplo, invertida).

[0348] En una realización, los primero y segundo de dominios interruptores pueden formar un interruptor de dimerización intracelular o extracelular. En una realización, el interruptor de dimerización puede ser un interruptor de homodimerización, por ejemplo, donde el primero y segundo dominios interruptores son los mismos, o un interruptor de heterodimerización, por ejemplo, donde el primero y segundo dominios interruptores son diferentes uno de otro.

[**0349]** En realizaciones, un RCAR puede comprender "múltiples interruptores". Múltiples interruptores pueden comprender dominios interruptores de heterodimerización o dominios interruptores homodimerización. Múltiples inerruptores comprenden una pluralidad de, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, dominios inerruptores, de forma independiente, en un primer miembro, por ejemplo, un miembro de unión a antígeno, y un segundo miembro, por ejemplo, un miembro de la señalización intracelular. En una realización, el primer miembro puede comprender una pluralidad de primeros dominios interruptores, por ejemplo, dominios interruptores basados en FKBP, y el segundo miembro puede comprender una pluralidad de segundos dominios interruptores, por ejemplo, dominios interruptores basados en FRB. En una realización, el primer miembro puede comprender un primer y un segundo dominio interruptor, por ejemplo, un dominio interruptor basado en FKBP y un dominio interruptor basado en FRB, y el segundo elemento pueden comprender un primer y un segundo dominio interruptor, por ejemplo, una dominio interruptor basado en FKBP y un dominio interruptor basado en FRB.

[0350] En una realización, el miembro de señalización intracelular comprende uno o más dominios de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular primaria y uno o más dominios de señalización coestimuladores.

[0351] En una realización, el miembro de unión a antígeno puede comprender uno o más dominios de señalización intracelular, por ejemplo, uno o más dominios de señalización coestimuladores. En una realización, el miembro de unión a antígeno comprende una pluralidad, por ejemplo, 2 o 3 dominios de señalización coestimuladores que se describen en el presente documento, por ejemplo, seleccionados de 41BB, CD28, CD27, ICOS y OX40, y en realizaciones, sin dominio de señalización intracelular primaria. En una realización, el miembro de unión a antígeno comprende los siguientes dominios de señalización coestimuladores, de dirección extracelular a intracelular: 4-1BB - CD27; 4-1BB - CD27; CD27 – 4-1BB; 4-1BB - CD28; CD28 – 4-1BB; OX40 - CD28; CD28 - OX40; CD28 – 4-1BB; o 4-1BB - CD28. En tales realizaciones, el miembro de unión intracelular comprende un dominio CD3zeta. En una de tal realizacón, el RCAR comprende (1) un miembro de unión a antígeno que comprende, un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y dos dominios coestimuladoras y un primer dominio interruptor; y (2) un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio transmembrana o dominio de unión a membrana y al menos un dominio de señalización intracelular primaria, y un segundo dominio interruptor.

[0352] Un ejemplo proporciona RCAR en los que el miembro de unión a antígeno no está unido a la superficie de la célula CAR. Esto permite que una célula que tiene un miembro de señalización intracelular se empareje convenientemente con uno o más dominios de unión a antígeno, sin transformar la célula con una secuencia que codifica el miembro de unión a antígeno. En tales casos, el RCAR comprende: 1) un miembro de señalización intracelular que comprende: un primer dominio interruptor, un dominio transmembrana, un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular primaria, y un primer dominio interruptor; y 2) un miembro de unión de antígeno que comprende: un dominio de unión a antígeno, y un segundo dominio interruptor, en el que el miembro de unión a antígeno no comprende un dominio transmembrana o el dominio de unión a membrana, y, opcionalmente, no comprende un dominio de señalización intracelular. En algunos casos, el RCAR puede comprender además 3) un segundo miembro de unión a antígeno que comprende: un segundo dominio de unión a antígeno, por ejemplo, un segundo dominio de unión a antígeno que se une un antígeno diferente que está unido por el dominio de unión a antígeno; y un segundo dominio interruptor.

[0353] En el presente documento también se proporcionan RCAR en los que el miembro de unión a antígeno comprende la capacidad de activación y reconocimiento biespecífico. En este caso, el miembro de unión a antígeno puede comprender una pluralidad, por ejemplo, 2, 3, 4, o 5 dominios de unión a antígeno, por ejemplo, scFv, en los que cada dominio de unión a antígeno se une a un antígeno diana, por ejemplo, diferentes antígenos o al mismo antígeno, por ejemplo, los mismos o diferentes epítopos en el mismo antígeno. En un ejemplo, la pluralidad de dominios de unión a antígeno están en tándem, y opcionalmente, una región conectora o bisagra está dispuesta entre cada uno de los dominios de unión a antígeno. Las regiones conectoras y regiones bisagra adecuadas se describen en el presente documento.

[0354] Un ejemplo proporciona RCAR que tienen una configuración que permite la conmutación de la proliferación. En este caso, el RCAR comprende: 1) un miembro de señalización intracelular que comprende: opcionalmente, un dominio transmembrana o el dominio de unión a membrana; uno o más dominios coestimuladores de señalización, por ejemplo, seleccionados de 4-1BB, CD28, CD27, ICOS, y OX40, y un dominio interruptor; y 2) un miembro de unión a antígeno que comprende: un dominio de unión al antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular primaria, por ejemplo, un dominio CD3zeta, en el que el miembro de unión a antígeno no comprende un dominio interruptor, o no comprende un dominio interruptor que dimeriza con un dominio interruptor en el miembro de señalización intracelular. En un ejemplo, el miembro de unión a antígeno no comprende un dominio coestimulador de señalización. En un ejemplo, el miembro de señalización intracelular comprende un dominio interruptor de un interruptor de homodimerización. En un ejemplo, el miembro de señalización intracelular comprende un primer dominio interruptor de un interruptor de heterodimerización y el RCAR comprende un segundo miembro de señalización intracelular que comprende un segundo dominio interruptor del interruptor de heterodimerización. En tales casos, el segundo miembro de señalización intracelular comprende los mismos dominios de señalización intracelulares que el miembro de señalización intracelular. En un ejemplo, el interruptor de dimerización es intracelular. En un ejemplo, el interruptor de dimerización es extracelular.

[0355] En cualquiera de las configuraciones de RCAR descritas en el presente documento, el primer y segundo dominios interruptores comprenden un interruptor basado en FKBP-FRB, tal como se describe en el presente documento.

[0356] En el presente documento también se proporcionan células que comprenden un RCAR descrito en el presente documento. Cualquier célula que esté diseñada para expresar un RCAR se puede utilizar como una célula RCARX. En un ejemplo, la célula RCARX es una célula T, y se denomina como una célula RCART. En un ejemplo, la célula RCARX es una célula NK, y se conoce como una célula RCARN.

[0357] En el presente documento también se proporcionan ácidos nucleicos y vectores que comprenden secuencias de codificación de RCAR. La secuencia que codifica diferentes elementos de un RCAR puede estar dispuesta en la misma molécula de ácido nucleico, por ejemplo, el mismo plásmido o vector, por ejemplo, vector viral, por ejemplo, vector lentiviral. En un ejemplo, (i) la secuencia que codifica un miembro de unión a antígeno y (ii) la secuencia que codifica un miembro de la señalización intracelular, pueden estar presentes en el mismo ácido nucleico, por ejemplo, vector. La producción de las proteínas correspondientes se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso de promotores separados, o mediante el uso de un producto de transcripción bicistrónico (que puede dar lugar a la producción de dos proteínas mediante la escisión de un solo producto de traducción o mediante la traducción de dos productos proteicos separados). En un ejemplo, una secuencia que codifica un péptido escindible, por ejemplo, una secuencia de P2A o F2A, está dispuesta entre (i) y (ii). En un ejemplo, una secuencia que codifica un IRES, por ejemplo, un IRES de EMCV o EV71, está dispuesto entre (i) y (ii). En estos casos, (i) y (ii) se transcriben como un único ARN. En un ejemplo, un primer promotor está unido operativamente a (i) y un segundo promotor está unido operativamente a (ii), tal que (i) y (ii) se transcriben como ARNm separados.

[0358] Alternativamente, la secuencia que codifica diferentes elementos de un RCAR puede estar dispuesta en diferentes moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, diferentes plásmidos o vectores, por ejemplo, vector viral, por ejemplo, vector lentiviral. Por ejemplo, la (i) secuencia que codifica un miembro de unión a antígeno puede estar presente en un primer ácido nucleico, por ejemplo, un primer vector, y la (ii) secuencia que codifica un miembro de la señalización intracelular puede estar presente en el segundo ácido nucleico, por ejemplo, el segundo vector.

Interruptores de dimerización

[0359] Los interruptores de dimerización pueden ser no covalentes o covalentes. En un interruptor de dimerización no covalente, la molécula de dimerización promueve una interacción no covalente entre los dominios interruptores. En un interruptor dimerización covalente, la molécula de dimerización promueve una interacción covalente entre los dominios interruptores.

[0360] En una realización, el RCAR comprende un interruptor de dimerización basado en FKBP/FRAP o FKBP/FRB. FKBP12 (FKBP, o proteína de unión a FK506) es una proteína citoplasmática abundante que sirve como la diana intracelular inicial para el fármaco inmunosupresor de producto natural, rapamicina. La rapamicina se une a FKBP y al homólogo de PI3K grande FRAP (RAFT, mTOR). FRB es una porción de 93 aminoácidos de FRAP, que es suficiente para la unión al complejo FKBP-rapamicina (Chen, J., Zheng, XF, Brown, EJ y Schreiber, SL (1995) Identification of an 11-kDa FKBP 12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serien residue. Proc Natl Acad Sci USA 92 4947-51)

[0361] En realizaciones, un FKBP/FRAP, por ejemplo, un interruptor basado en FKBP/FRB puede utilizar una molécula de dimerización, por ejemplo, rapamicina o un análogo de rapamicina.

[0362] La secuencia de aminoácidos de FKBP es la siguiente:

DVPDYASLGGPSSPKKKRKVSRGVQVETISPGDGRTFPK RGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRG WEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFD VELLKLETSY (SEQ ID NO: 90)

[0363] En las realizaciones, un dominio interruptor de FKBP puede comprender un fragmento de FKBP que tiene la capacidad de unirse con FRB, o un fragmento o análogo del mismo, en presencia de rapamicina o un rapálogo, por ejemplo, la parte subrayada de la SEq ID NO: 90, que es:

VQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSR DRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYA YGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLETS (SEQ ID NO: 91)

[0364] La secuencia de aminoácidos de FRB es la siguiente:

ILWHEMWHEG LEEASRLYFG ERNVKGMFEV LEPLHAMMER GPQTLKETSF NQAYGRDLME AQEWCRKYMK SGNVKDLTQA WDLYYHVFRR ISK (SEQ ID NO: 92)

[0365] "FKBP/FRAP, por ejemplo, un interruptor basado en FKBP/FRB", tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a un interruptor de dimerización que comprende: un primer dominio interruptor, que comprende un fragmento de FKBP o análogo del mismo que tiene la capacidad de unirse con FRB, o un fragmento o análogo del mismo, en presencia de rapamicina o un rapálogo, por ejemplo, RAD001, y tiene al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad con, o difiere en no más de 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 residuos de aminoácidos de, la secuencia de FKBP de la SEQ ID NO: 90 o 91; y un segundo dominio interruptor, que comprende un fragmento de FRB o análogo del mismo que tiene la capacidad de unirse con FRB, o un fragmento o análogo del mismo, en presencia de rapamicina o un rapálogo, y tiene al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad con, o difiere en no más de 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 residuos de aminoácidos de, la secuencia de FRB de SEQ ID NO: 92. En un ejemplo, un RCAR descrito en el presente documento comprende un dominio interruptor que comprende residuos de aminoácidos descritos en la SEQ ID NO: 90 (o SEQ ID NO: 91), y un dominio interruptor que comprende residuos de aminoácidos descritos en la SEQ ID NO: 92.

[0366] En realizaciones, el interruptor de dimerización FKBP/FRB comprende un dominio interruptor FRB modificado que exhibe una formación de complejo alterada, por ejemplo, mejorada, entre un dominio interruptor basado en FRB, por ejemplo, el dominio interruptor FRB modificado, un dominio interruptor basado en FKBP , y la molécula de dimerización, por ejemplo, rapamicina o un rapálogo, por ejemplo, RAD001. En una realización, el dominio interruptor FRB modificado comprende una o más mutaciones, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, seleccionadas de mutaciones en la posición o posiciones de aminoácido L2031, E2032, S2035, R2036, F2039, G2040, T2098, W2101, D2102, Y2105, y F2108, donde el aminoácido de tipo salvaje se muta a cualquier otro aminoácido natural. En una realización, un FRB mutante comprende una mutación en E2032, donde E2032 está mutado a fenilalanina (E2032F), metionina (E2032M), arginina (E2032R), valina (E2032V), tirosina (E2032Y), isoleucina (E2032I), por ejemplo, SEQ ID NO: 93, o leucina (E2032L), por ejemplo, SEQ ID NO: 94. En una realización, un FRB mutante comprende una mutación en T2098, donde T2098 está mutado a fenilalanina (T2098F) o leucina (T2098L), por ejemplo, SEQ ID NO: 95. En una realización, un FRB mutante comprende una mutación en E2032 y T2098, donde E2032 está mutado a cualquier aminoácido, y donde T2098 está mutado a cualquier aminoácido, por ejemplo, SEQ ID NO: 96. En una realización, un FRB mutante comprende una mutación E2032I y T2098L, por ejemplo, SEQ ID NO: 97. En una realización, un FRB mutante comprende una mutación E2032L y T2098L, por ejemplo, SEQ ID NO: 98.

Tabla 10. FRB mutantes de ejemplo que tienen mayor afinidad por una molécula de dimerización

Mutante de FRB	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
Mutante E2032I	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	93
Mutante E2032L	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	94
Mutante T2098L	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	95
Mutante E2032, T2098	ILWHEMWHEGL**X**EASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDL**X**QAWDLYYHVFRRISKTS	96
Mutante E2032I, T2098L	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	97
Mutante E2032L, T2098L	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	98

[0367] Otros interruptores de dimerización adecuados incluyen un interruptor de dimerización basado en GyrB-GyrB, un interruptor de dimerización basado en giberelina, un interruptor de dimerización de etiqueta/aglutinante, y un interruptor de dimerización de halo-etiqueta/snap-etiqueta. Siguiendo las directrices proporcionadas en el presente documento, dichos interruptores y moléculas de dimerización relevantes serán evidentes para un experto en la materia.

Molécula de dimerización

[0368] La asociación entre los dominios interruptores es promovida por la molécula de dimerización. En presencia de la molécula de dimerización, la interacción o la asociación entre los dominios interruptores permite la transducción de señales entre un polipéptido asociado con, por ejemplo, fusionado a, un primer dominio interruptor y un polipéptido asociado con, por ejemplo, fusionado a, un segundo dominio interruptor. En presencia de niveles no limitantes de la molécula de dimerización, la transducción de señales se incrementa en 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 5, 10, 50, 100 veces, por ejemplo, tal como se mide en un sistema descrito en el presente documento.

[0369] La rapamicina y análogos de rapamicina (a veces conocido como rapálogos), por ejemplo, RAD001, se pueden utilizar como moléculas de dimerización en un interruptor de dimerización basado en FKBP/FRB descrito en el presente documento. En un ejemplo, la molécula de dimerización se puede seleccionar de rapamicina (sirolimus), RAD001 (everolimus), zotarolimus, temsirolimus, AP-23573 (ridaforolimus), biolimus y AP21967. Análogos de rapamicina adicionales adecuados para su uso con los interruptores de dimerización basados en FKBP/FRB se describen adicionalmente en la sección titulada "Terapias de Combinación", o en la subsección titulada "Inhibidores de mTOR".

CAR SPLIT (“CAR de división”)

[0370] En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR utiliza un CAR de división. El enfoque CAR de división se describe en más detalle en las publicaciones WO2014/055442 y WO2014/055657. Brevemente, un sistema de CAR de división comprende una célula que expresa una primer CAR que tiene un primer dominio de unión a antígeno y un dominio coestimulador (por ejemplo, 4-1BB), y la célula también expresa un segundo CAR que tiene un segundo dominio de unión a antígeno y un dominio de señalización intracelular (por ejemplo, CD3 zeta). Cuando la célula se encuentra con el primer antígeno, el dominio coestimulador se activa, y la célula prolifera. Cuando la célula se encuentra con el segundo antígeno, el dominio de señalización intracelular se activa y comienza la actividad de destrucción celular. Por lo tanto, la célula que expresa CAR sólo se activa completamente en presencia de ambos antígenos. En realizaciones, el primer dominio de unión a antígeno reconoce un antígeno asociado a cáncer descrito en el presente documento (por ejemplo, CD19, CD123, CD22, CD30, CD34, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, Tn Ag , PSMA, ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EpCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, mesotelina, IL-11Ra, PSCA, VEGFR2, LewisY, CD24, PDGFR-beta, SSEA-4, CD20, receptor alfa de folato, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, EGFR, NCAM, prostasa, PAP, ELF2M, Efrina B2, receptor de IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, tirosinasa, EphA2, fucosil GM1, sLE , GM3, TGS5, HMWMAA, o-acetil-GD2, receptor beta de folato, TEM1/CD248, TEM7R, Cldn6, TSHR, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, ácido plisiálico, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, legumaina, HPV E6, E7, MAGE-A1, MAGE A1, ETV6-AML, proteína de esperma 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, antígeno 1 relacionado con Fos, p53, p53 mutante, prosteina, survivina y telomerasa, PCTA-1/galectina 8, MelanA/MART1, Ras mutante, hTERT, puntos de interrupción de la translocación de sarcoma, ML-IAP, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, receptor de andrógenos, ciclina B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP- 4, SSX2, RAGE-1, transcriptasa inversa de telomerasa humana,

RU1, RU2, carboxil esterasa intestinal, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, o IGLL1).

CONSTRUCCIONES DE ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICA UN CAR

[0371] La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una o más construcciones de CAR descritas en el presente documento. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se proporciona como un transcrito de ARN mensajero. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se proporciona como una construcción de ADN.

[0372] Por consiguiente, en un aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en el que el CAR comprende un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno tumoral descrito en el presente documento, un dominio transmembrana (por ejemplo, un dominio transmembrana descrito en el presente documento), y un dominio de señalización intracelular (por ejemplo, un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento) que comprende un dominio estimulador, por ejemplo, un dominio coestimulador de señalización (por ejemplo, un dominio coestimulador de señalización descrito en el presente documento) y/o un dominio de señalización primaria (por ejemplo, un dominio de señalización primaria descrito en el presente documento, por ejemplo, una cadena zeta descrita en el presente documento). En un ejemplo, el dominio transmembrana es un dominio de transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En algunos casos, un dominio transmembrana puede incluir al menos la región o regiones transmembrana de, por ejemplo, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 41BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R α, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f , ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/CBP.

[0373] En un ejemplo, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En algunos casos, un dominio transmembrana puede incluir al menos la región o regiones transmembrana de, por ejemplo, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 41BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R α, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f , ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/CBP. En un ejemplo, el dominio transmembrana comprende una secuencia que codifica la SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 42, o una secuencia con 95-99% de identidad con las mismas.

[0374] En un ejemplo, el dominio de unión al antígeno está conectado al dominio transmembrana por una región bisagra, por ejemplo, una bisagra descrita en el presente documento. En un ejemplo, la región bisagra comprende una secuencia que codifica SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10, o una secuencia con 95-99% de identidad con las mismas.

[0375] En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico aislada comprende además una secuencia que codifica un dominio coestimulador. En un ejemplo, el dominio coestimulador es un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en molécula MHC de clase I, proteínas del receptor de TNF, proteínas similares a una inmunoglobulina, receptores de citocinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores de células NK activadores, BTLA, un receptor de ligando Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1 , CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLA MF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/CBP, CD19a, y un ligando que se une específicamente con CD83. En los ejemplos, el dominio coestimulador comprende 4-1BB, CD27, CD28, o ICOS.

[0376] En un ejemplo, el dominio coestimulador comprende una secuencia que codifica SEQ ID NO: 16, o una secuencia con 95-99% de identidad de la misma. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB y un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia que codifica SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ

ID NO: 40 o SEQ ID NO: 44, o una secuencia con una identidad del 95-99% con las mismas, y una secuencia que codifica SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20, o una secuencia con una identidad del 95-99 % con las mismas, en el que las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una sola cadena polipeptídica.

[0377] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una construcción CAR que comprende una secuencia líder de la SEQ ID NO: 3, un dominio scFv tal como se describe en el presente documento, una región bisagra de la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 11 (o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas), un dominio transmembrana que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 43 (o una secuencia con un 95-99% de identidad de las mismas), un dominio coestimulador 4-1BB que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 15 o un dominio coestimulador CD27 que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17 o un dominio coestimulador ICOS que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 41 o 45 (o una secuencia con un 95-99% de identidad de las mismas), y un dominio estimulador CD3 zeta que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 19 (CD3 zeta mutante) o SEQ ID NO: 21 (CD3 zeta de tipo salvaje humano) o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas.

[0378] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión al antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio estimuldor, y en el que dicho dominio de unión a antígeno se une a un antígeno tumoral seleccionado de un grupo que consiste en: CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, Tn Ag, PSMA, ROR1, FLT3 , FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EpCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, mesotelina, IL-11Ra, PSCA, VEGFR2, LewisY, CD24, PDGFR-beta, SSEA-4, CD20, receptor alfa de folato, erbB2 (Her2/neu), MUC1, EGFR, NCAM, prostasa, PRSS21, PAP, ELF2M, Efrina B2, receptor de IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, tirosinasa, EphA2, fucosil GM1, SLE, GM3, TGS5, HMWMAA, o-acetil-GD2, receptor beta de folato, TEM1/CD248, TEM7R, Cldn6, TSHR, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, ácido plisiálico, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR5 1E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, legumaina, HPV E6, E7, MAGE A1, ETV6-AML, proteína de esperma 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD -CT-2, antígeno relacionado con Fos 1, p53, p53 mutante, prosteína, survivina y telomerasa, PCTA-1/galectina 8, MelanA/MART1, Ras mutante, hTERT, puntos de interrupción de translocación sarcoma, ML-IAP, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, receptor de andrógenos, ciclina B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, transcriptasa inversa de telomerasa humana, RU1, RU2, carboxil esterasa intestinal, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5 e IGLL1.

[0379] Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las moléculas deseadas se pueden obtener usando procedimientos recombinantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante el cribado de bibliotecas de células que expresan el gen, derivando el gen a partir de un vector que se conoce que incluye el mismo, o mediante el aislamiento directamente de células y tejidos que contienen el mismo, utilizando técnicas estándar. Alternativamente, el gen de interés puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.

VECTORES QUE CODIFICAN UN CAR

[0380] La presente descripción también proporciona vectores en los que se inserta un ADN de la presente descripción. Los vectores derivados de retrovirus, tales como los lentivirus, son herramientas adecuadas para lograr la transferencia de genes a largo plazo, ya que permiten una integración estable a largo plazo de un transgén y su propagación en células hijas. Los vectores lentivirales tienen la ventaja añadida sobre los vectores derivados de onco-retrovirus, tales como el virus de la leucemia murina, en que pueden transducir células no proliferantes, tales como hepatocitos. También tienen la ventaja añadida de baja inmunogenicidad. Un vector retroviral también puede ser, por ejemplo, un vector gammaretroviral. Un vector gammaretroviral puede incluir, por ejemplo, un promotor, una señal de empaquetamiento (ψ), un sitio de unión a cebador (PBS), uno o más (por ejemplo, dos) repeticiones terminales largas (LTR), y un transgén de interés, por ejemplo, una gen que codifica un CAR. Un vector gammaretroviral puede carecer de genes estructurales virales, tales como gag, pol, y env. Los vectores gammaretrovirales de ejemplo incluyen Virus de la leucemia murina (MLV), virus formador de focos en el bazo (SFFV) y el virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV), y vectores derivados de los mismos. Otros vectores gammaretrovirales se describen, por ejemplo, en Tobias Maetzig et al, "Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application". Viruses. 2011 Jun; 3 (6): 677-713.

[0381] En otro ejemplo, el vector que comprende el ácido nucleico que codifica el CAR deseado de la descripción es un vector adenoviral (A5/35). En otro ejemplo, la expresión de ácidos nucleicos que codifican los CAR se puede realizar usando transposones, tales como bella durmiente, crisper, CAS9, y nucleasas de dedos de zinc. Ver abajo June y col. 2009 Nature Reviews Immunology 9.10: 704-716.

[0382] En resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican los CAR se consigue típicamente mediante unión operativa de un ácido nucleico que codifica el polipéptido CAR o partes del mismo a un promotor, y la incorporación de la construcción en un vector de expresión. Los vectores pueden ser adecuados para la replicación e integración en eucariotas. Los vectores de clonación típicos contienen terminadores de transcripción

y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada.

[0383] Las construcciones de expresión de la presente descripción también se pueden usar para la inmunización de ácidos nucleicos y terapia génica, usando protocolos de suministro de genes estándar. Los procedimientos para el suministro de genes son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos. Nos. 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466. En otro caso, la presente descripción proporciona un vector de terapia génica.

[0384] El ácido nucleico puede clonarse en un cierto número de tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico puede clonarse en un vector que incluye, pero no limitado a, un plásmido, un fagémido, un derivado del fago, un virus animal, y un cósmido. Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación.

[0385] Además, el vector de expresión se puede proporcionar a una célula en forma de un vector viral. La tecnología de vector viral es bien conocido en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al, 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY), y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus, que son útiles como vectores incluyen, pero no se limitan a, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios de endonucleasa de restricción convenientes, y uno o más marcadores seleccionables, (por ejemplo, WO 01/96584; WO 01/29058; y la patente de Estados Unidos. No. 6.326.193).

[0386] Se han desarrollado un conjunto de sistemas basados en virus para la transferencia génica en células de mamífero. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para sistemas de suministro de genes. Un gen seleccionado puede insertarse en un vector y se empaqueta en partículas retrovirales usando técnicas conocidas en la técnica. El virus recombinante puede entonces ser aislado y suministrado a células del sujeto ya sea in vivo o ex vivo. En la técnica se conoce un número de sistemas retrovirales. En algunas realizaciones, se usan vectores de adenovirus. En la técnica se conoce un número de vectores de adenovirus. En una realización, se usan vectores de lentivirus. Los promotores de ejemplo incluyen los promotores del gen de CMV IE, EF-1α, ubiquitina C o (PGK) fosfogliceroquinasa. En una realización, el promotor es un promotor PGK, por ejemplo, un promotor PGK truncado tal como se describe en el presente documento.

[0387] Los elementos promotores adicionales, por ejemplo, potenciadores, regulan la frecuencia de iniciación de la transcripción. Típicamente, estos se encuentran en la región de 30-110 pb en dirección 5' del sitio de inicio, aunque un número de promotores han demostrado que contienen elementos funcionales en dirección 3' del sitio de inicio también. El espaciado entre los elementos promotores frecuentemente es flexible, de modo que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven uno respecto al otro. En el promotor de la timidina quinasa (tk), la separación entre elementos promotores puede aumentarse a 50 pb antes de que la actividad comience a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar ya sea cooperativamente o independientemente para activar la transcripción.

[0388] Un ejemplo de un promotor que es capaz de expresar una molécual de ácido nucleico que codifica un CAR en una célula T de mamífero es el promotor EF1a. El promotor EF1a nativo impulsa la expresión de la subunidad alfa del complejo del factor de elongación-1, que es responsable del suministro enzimático de aminoacil ARNt al ribosoma. El promotor EF1a se ha utilizado ampliamente en los plásmidos de expresión de mamíferos y ha demostrado ser eficaz en impulsar la expresión CAR a partir de moléculas de ácido nucleico clonadas en un vector lentiviral. Véase, por ejemplo, Milone et al., Mol. Ther. 17 (8): 1453-1464 (2009). En un aspecto, el promotor EF1a comprende la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 1.

[0389] Otro ejemplo de un promotor es la secuencia de promotor de citomegalovirus inmediato temprano (CMV). Esta secuencia de promotor es una secuencia de promotor constitutivo fuerte capaz de impulsar altos niveles de expresión de cualquier secuencia de polinucleótido ligada operativamente a la misma. Sin embargo, también se pueden usar otras secuencias de promotores constitutivos, incluyendo, pero no limitado a, promotor temprano del virus de simio 40 (SV40), virus de tumor mamario de ratón (MMTV), promotor de la repetición larga terminal (LTR) de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el promotor MoMuLV, un promotor de virus de la leucemia aviar, un promotor inmediato temprano del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos, tales como, pero no limitado a, el promotor de actina, el promotor de miosina, el factor de elongación-1α , el promotor, el promotor de la hemoglobina y el promotor de la creatina quinasa. Además, la invención no debe limitarse al uso de promotores constitutivos. Los promotores inducibles también se contemplan como parte de la invención. El uso de un promotor inducible proporciona un interruptor molecular capaz de activar la expresión de la secuencia de polinucleótido al que está unido operativamente cuando se desea tal expresión, o desactivar la expresión cuando no se desea la expresión. Ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de la progesterona y un promotor de tetraciclina.

[0390] Otro ejemplo de un promotor es el promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK). En realizaciones, se puede

desear un promotor PGK truncado (por ejemplo, un promotor PGK con uno o más, por ejemplo, 1, 2, 5, 10, 100, 200, 300, o 400, deleciones de nucleótidos en comparación con la secuencia del promotor PGK de tipo salvaje). Las secuencias de nucleótidos de los promotores PGK de ejemplo se proporcionan a continuación.

[0391] Promotor PGK WT:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACG
CGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGA
TGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGC
GCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGT
AACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCA
AATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCGCCTC
GTCCTTCGCAGCGGCCCCCCGGGTGTTCCCATCGCCGCTTCTAGGCCCACTGCGAC
GCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCGCGGCGACGCAAAGGGCCT
TGGTGCGGGTCTCGTCGGCGCAGGGACGCGTTTGGGTCCCGACGGAACCTTTTCCG
CGTTGGGGTTGGGGCACCATAAGCT (SEQ ID NO: 99)

[0392] Promotores de PGK truncados de ejemplo:

PGK100:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACG
CGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGA
TGGCGGGGTG (SEQ ID NO: 100)

PGK200:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACG
CGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGA
TGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGC
GCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGT
AACG (SEQ ID NO:101)

PGK300:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACG
CGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGA
TGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGC
GCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGT
AACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCA
AATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCG (SEQ
ID NO:102)

PGK400:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACG
CGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGA
TGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGC
GCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGT
AACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCA
AATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCGCCTC
GTCCTTCGCAGCGGCCCCCCGGGTGTTCCCATCGCCGCTTCTAGGCCCACTGCGAC
GCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCG (SEQ ID NO:103)

[0393] Un vector también puede incluir, por ejemplo, una secuencia señal para facilitar la secreción, una señal de poliadenilación y un terminador de la transcripción (por ejemplo, gen de hormona de crecimiento bovina (BGH)), un elemento que permite la replicación episomal y la replicación en procariotas (por ejemplo, origen SV40 y ColE1 u otros conocidos en la técnica) y/o elementos para permitir la selección (por ejemplo, gen de resistencia a ampicilina y/o marcador de zeocina).

[0394] Con el fin de evaluar la expresión de un polipéptido CAR o porciones del mismo, el vector de expresión que se introduce en una célula también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen informador o ambos para facilitar la identificación y selección de células expresadoras de la población de células que se pretende transfectar o infectar a través de vectores virales. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede contenerse en un trozo separado de ADN y usarse en un procedimiento de co-transfección. Los marcadores seleccionables y genes informadores pueden estar flanqueados con secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células huésped. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tales como neo y similares.

[0395] Los genes informadores se usan para identificar células potencialmente transfectadas o transducidas y para evaluar la funcionalidad de secuencias reguladoras. En general, un gen informador es un gen que no está presente en o es expresado por el organismo o tejido receptor y que codifica un polipéptido cuya expresión se manifiesta por alguna propiedad fácilmente detectable, por ejemplo, la actividad enzimática. La expresión del gen informador se ensaya en un momento adecuado después de que el ADN se ha introducido en las células receptoras. Los genes informadores adecuados pueden incluir genes que codifican luciferasa, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa, fosfatasa alcalina secretada, o el gen de la proteína verde fluorescente (por ejemplo, Ui-Tei et al, 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Los sistemas de expresión adecuados son bien conocidos y se pueden preparar usando técnicas conocidas u obtenerse comercialmente. En general, la construcción con la región flanqueante 5' mínima que muestra el nivel más alto de expresión del gen informador se identifica como el promotor. Tales regiones promotoras pueden estar ligadas a un gen informador y utilizarse para evaluar agentes para la capacidad de modular la transcripción impulsada por promotor.

[0396] En ejemplos, el vector puede comprender dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican un CAR, por ejemplo, un primer CAR descrito en el presente documento y un segundo CAR, por ejemplo, un CAR inhibidor o un CAR que se une específicamente a un segundo antígeno, por ejemplo, otro antígeno asociado a cáncer descrito en el presente documento (por ejemplo, CD19, CD123, CD22, CD30, CD34, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, Tn Ag, PSMA, ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EpCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, mesotelina, IL-11Ra, PSCA, VEGFR2, LewisY, CD24, PDGFR-beta, SSEA-4, CD20, receptor alfa de folato, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, EGFR, NCAM, prostasa, PAP, ELF2M, Efrina B2, receptor de IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, tirosinasa, EphA2, fucosil GM1, SLE, GM3, TGS5, HMWMAA, o-acetil-GD2, receptor beta de folato, TEM1/CD248, TEM7R, Cldn6, TSHR, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, ácido plisiálico, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20 , LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, legumain, HPV E6, E7, MAGE-A1, MAGE A1, ETV6-AML, proteína de esperma 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, antígeno 1 relacionado con Fos, p53, p53 mutante, prosteina, survivina y telomerasa, PCTA-1/galectina 8, MelanA/MART1, Ras mutante, hTERT, puntos de interrupción de translocación de sarcoma, ML-IAP, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, receptor de andrógenos, ciclina B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, transcriptasa inversa de telomerasa humana, RU1, RU2, carboxil esterasa intestinal, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75 , GPC3, FCRL5, o IGLL1). En tales casos, las dos o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican el CAR están codificadas por una sola molécula de ácido nucleico en el mismo marco y como una sola cadena polipeptídica. En este aspecto, los dos o más CARs, pueden, por ejemplo, estar separados por uno o más sitios de escisión del

péptido (por ejemplo, un sitio de auto-escisión o un sustrato para una proteasa intracelular). Ejemplos de sitios de escisión de péptidos incluyen los siguientes, en donde los residuos GSG son opcionales:

T2A: (GSG) EGRGSLLTCGDVEENPGP (SEQ ID NO: 104)
P2A: (GSG) ATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 105)
E2A: (GSG) QCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 106)
F2A: (GSG) VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 107)

[0397] Los procedimientos para introducir y expresar genes en una célula se conocen en la técnica. En el contexto de un vector de expresión, el vector puede introducirse fácilmente en una célula huésped, por ejemplo, de mamífero, bacteriana, de levadura o célula de insecto mediante cualquier procedimiento en la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión se puede transferir en una célula huésped por medios biológicos, físicos o químicos.

[0398] Los procedimientos físicos para la introducción de un polinucleótido en una célula huésped incluyen precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación, y similares. Los procedimientos para producir células que comprenden los vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al, 2012, Molecular Cloning: A laboratory Manual, volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Press, Nueva York). Un procedimiento preferido para la introducción de un polinucleótido en una célula huésped es la transfección con fosfato de calcio.

[0399] Los procedimientos biológicos para la introducción de un polinucleótido de interés en una célula huésped incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales, y especialmente vectores retrovirales, se han convertido en el procedimiento más ampliamente usado para insertar genes en células de mamífero, por ejemplo, humanas. Otros vectores virales pueden derivarse de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simplex I, adenovirus y virus adeno-asociados, y similares. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos. Nos. 5.350.674 y 5.585.362.

[0400] Los medios químicos para la introducción de un polinucleótido en una célula huésped incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal a modo de ejemplo para su uso como un vehículo de suministro in vitro e in vivo es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial). Otros procedimientos de suministro dirigido del estado de la técnica de ácidos nucleicos están disponibles, tales como el suministro de polinucleótidos con nanopartículas dirigidas u otro sistema de suministro de tamaño de submicras adecuado.

[0401] En el caso en que se utiliza un sistema de suministro no viral, un vehículo de suministro a modo de ejemplo es un liposoma. El uso de formulaciones de lípidos se contempla para la introducción de los ácidos nucleicos en una célula huésped (in vitro, ex vivo o in vivo). En otro aspecto, el ácido nucleico puede estar asociado con un lípido. El ácido nucleico asociado con un lípido se puede encapsular en el interior acuoso de un liposoma, intercalarse en la bicapa lipídica de un liposoma, unido a un liposoma mediante una molécula de unión que está asociada con el liposoma y el oligonucleótido, atrapado en un liposoma, complejado con un liposoma, dispersado en una solución que contiene un lípido, mezclado con un lípido, combinado con un lípido, contenido como una suspensión en un lípido, contenido o complejado con una micela, o, de otro modo, asociado con un lípido. Las composiciones asociadas a lípidos, lípidos/ADN o lípido/vector de expresión no se limitan a ninguna estructura particular en solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura bicapa, como micelas, o con una estructura "colapsada". Pueden también simplemente intercalarse en una solución, posiblemente formando agregados que no son uniformes en tamaño o forma. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser de origen natural o lípidos sintéticos. Por ejemplo, los lípidos incluyen gotitas grasas que se producen de forma natural en el citoplasma, así como la clase de compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, tales como ácidos grasos, alcoholes, aminas, amino alcoholes, y aldehídos.

[0402] Los lípidos adecuados para su uso se pueden obtener de fuentes comerciales. Por ejemplo, dimiristil fosfatidilcolina ("DMPC") puede obtenerse de Sigma, St. Louis, MO; fosfato de dicetilo ("DCP") se puede obtener de K & K Laboratories (Plainview, NY); colesterol ("Choi") se puede obtener de Calbiochem-Behring; dimiristil fosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos se pueden obtener de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL.). Las soluciones madre de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol pueden almacenarse a aproximadamente - 20°C. El cloroformo se usa como el único disolvente, ya que se evapora más fácilmente que el metanol. "Liposoma" es un término genérico que abarca una variedad de vehículos lipídicos individuales y multilamelares formados por la generación de bicapas o agregados cerrados de lípidos. Los liposomas se pueden caracterizar por tener estructuras vesiculares con una membrana bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas de lípidos separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos experimentan una autoredistribución antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh et al, 1991 Glycobiology 5: 505-10). Sin embargo, las composiciones que tienen diferentes estructuras en solución más allá de la estructura vesicular normal, también están comrpendidos. Por ejemplo, los lípidos pueden asumir una estructura micelar o simplemente existir como agregados no uniformes de moléculas de lípidos. También se

contemplan complejos de lipofectamina-ácido nucleico.

[0403] Independientemente del procedimiento utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula huésped o, en cualquier caso, exponer una célula al inhibidor de la presente descripción, con el fin de confirmar la presencia de la secuencia de ADN o ARN recombinante en la célula huésped, pueden realizarse una variedad de ensayos. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos "biológicos moleculares" bien conocidos por los expertos en la técnica, tal como transferencia Southern y Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", tales como la detección de la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, mediante medios inmunológicos (ELISA y transferencias de Western) o por ensayos descritos en el presente documento para identificar agentes que caen dentro del alcance de la descripción.

[0404] La presente descripción proporciona además un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR. En un aspecto, un vector del CAR se puede transducir directamente en una célula, por ejemplo, una célula T. En un aspecto, el vector es un vector de clonación o expresión, por ejemplo, un vector que incluye, pero no limitado a, uno o más plásmidos (por ejemplo, plásmidos de expresión, vectores de clonación, minicírculos, minivectores, cromosomas dobles minuto), construcciones de vectores retrovirales y lentivirales. En un aspecto, el vector es capaz de expresar la construcción de CAR en las células T, por ejemplo, células T CD4+ o células T CD8+. En un aspecto, la célula T de mamífero es una célula T humana.

ARN QUE CODIFICAN CAR; TRANSFECCIÓN DE ARN

[0405] También se describen en el presente documento procedimientos para la producción de un CAR de ARN transcrito in vitro. La presente descripción incluye una construcción de ARN que codifica CAR que se puede transfectar directamente en una célula. Un procedimiento para generar ARNm para el uso en la transfección puede implicar la transcripción in vitro (IVT) de una plantilla con cebadores diseñados especialmente, seguido de adición de poliA, para producir una construcción que contiene secuencia no traducida 3' y 5' ('UTR'), un bloqueador 5' y/o sitio de entrada de ribosoma interno (IRES), el ácido nucleico a expresar, y una cola de poliA, típicamente de 50-2000 bases de longitud (SEQ ID NO: 32). El ARN así producido puede transfectar eficientemente diferentes tipos de células. En un aspecto, la plantilla incluye secuencias para el CAR.

[0406] En un aspecto, un CAR de la presente descripción está codificado por un ARN mensajero (ARNm). En un aspecto, el ARNm que codifica un CAR descrito en el presente documento se introduce en una célula T para la producción de una célula CART.

[0407] En un ejemplo, el CAR de ARN transcrito in vitro puede ser introducido en una célula como una forma de transfección transitoria. El ARN se produce mediante la transcripción in vitro usando una plantilla generada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN de interés de cualquier fuente puede convertirse directamente por PCR en una plantilla para síntesis de ARNm in vitro usando cebadores apropiados y la ARN polimerasa. La fuente del ADN puede ser, por ejemplo, ADN genómico, ADN plasmídico, ADN de fago, ADNc, secuencia de ADN sintético o cualquier otra fuente apropiada de ADN. La plantilla deseada para la transcripción in vitro es un CAR descrito en el presente documento. Por ejemplo, la plantilla para el CAR de ARN comprende una región extracelular que comprende un dominio variable de la cadena única de un anticuerpo para un antígeno asociado a tumor descrito en el presente documento; una región de bisagra (por ejemplo, una región de bisagra descrita en el presente documento), un dominio transmembrana (por ejemplo, un dominio transmembrana descrito en el presente documento, tal como un dominio transmembrana de CD8a); y una región citoplasmática que incluye un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento, por ejemplo, que comprende el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB.

[0408] En un caso, el ADN para ser utilizado para la PCR contiene un marco de lectura abierto. El ADN puede ser de una secuencia de ADN de origen natural del genoma de un organismo. En un caso, el ácido nucleico puede incluir algunos o todas de las regiones no traducidas 5' y/o 3' (UTR). El ácido nucleico puede incluir exones e intrones. En un caso, el ADN para ser utilizado para la PCR es una secuencia de ácido nucleico humana. En otro ejemplo, el ADN para ser utilizado para la PCR es una secuencia de ácido nucleico humano que incluye las UTR 5' y 3'. El ADN puede ser alternativamente una secuencia de ADN artificial que normalmente no se expresa en un organismo de origen natural. Una secuencia de ADN artificial de ejemplo es uno que contiene porciones de genes que se ligan entre sí para formar un marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión. Las porciones de ADN que se ligan juntos pueden ser de un solo organismo o de más de un organismo.

[0409] Se utiliza PCR para generar una plantilla para la transcripción in vitro de ARNm que se usa para la transfección. Los procedimientos para realizar la PCR son bien conocidos en la técnica. Los cebadores para uso en PCR están diseñados para tener regiones que son sustancialmente complementarias a las regiones del ADN para ser utilizado como una plantilla para la PCR. "Sustancialmente complementaria", como se utiliza en el presente documento, se refiere a secuencias de nucleótidos donde una mayoría o la totalidad de las bases en la secuencia del cebador son complementarias, o una o más bases no son complementarias, o no coincidentes. Las secuencias sustancialmente complementarias son capaces de unirse o hibridarse con la diana de ADN pretendida en condiciones de unión utilizadas para la PCR. Los cebadores pueden ser diseñados para ser sustancialmente

complementarios a cualquier parte de la plantilla de ADN. Por ejemplo, los cebadores pueden ser diseñados para amplificar la porción de un ácido nucleico que normalmente se transcribe en las células (el marco de lectura abierto), incluyendo UTRs 5' y 3'. Los cebadores también se pueden diseñar para amplificar una porción de un ácido nucleico que codifica un dominio particular de interés. En un caso, los cebadores se diseñaron para amplificar la región de codificación de un ADNc humano, incluyendo la totalidad o porciones de las UTRs 5' y 3'. Los cebadores útiles para la PCR se pueden generar por procedimientos sintéticos que son bien conocidos en la técnica. "Cebadores directos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a los nucleótidos en la plantilla de ADN que están en dirección 5' de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "En dirección 5'" se utiliza en el presente documento para referirse a una localización 5, a la secuencia de ADN a amplificar con relación a la cadena de codificación. Los "cebadores inversos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a una plantilla de ADN de doble cadena que están en dirección 3' de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Dirección 3'" se utiliza en el presente documento para referirse a un lugar 3' con respecto a la secuencia de ADN que va a amplificarse con respecto a la cadena de codificación.

[0410] Cualquier ADN polimerasa útil para la PCR se puede utilizar en los procedimientos descritos en el presente documento. Los reactivos y la polimerasa están disponibles comercialmente de un número de fuentes.

[0411] Las estructuras químicas con la capacidad de promover la estabilidad y/o la eficacia de traducción también se pueden usar. El ARN tiene preferiblemente UTRs 5' y 3'. En una realización, el 5' UTR tiene entre uno y 3000 nucleótidos de longitud. La longitud de las secuencias de UTR 5' y 3' que se añaden a la región de codificación puede altrarse mediante diferentes procedimientos, incluyendo, pero no limitado a, el diseño de cebadores para PCR que se hibridan con diferentes regiones de las UTRs. Usando este enfoque, una persona de experiencia ordinaria en la técnica puede modificar las longitudes de UTR 5' y 3' necesarias para lograr la eficacia de traducción óptima después de la transfección del ARN transcrito.

[0412] Las UTR 3' y 5' pueden ser UTR 5' y 3' endógenas de origen natural para el ácido nucleico de interés. Alternativamente, las secuencias UTR que no son endógenas al ácido nucleico de interés se pueden añadir mediante la incorporación de las secuencias de UTR en los cebadores directo e inverso o mediante cualquier otra modificación de la plantilla. El uso de secuencias UTR que no son endógenas al ácido nucleico de interés puede ser útil para la modificación de la estabilidad y/o la eficacia de la traducción del ARN. Por ejemplo, se sabe que los elementos ricos en AU en las secuencias de UTR 3' pueden disminuir la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, las 3' UTR pueden ser seleccionadas o diseñadas para aumentar la estabilidad del ARN transcrito basado en propiedades de UTR que son bien conocidos en la técnica.

[0413] En una realización, la UTR 5' puede contener la secuencia de Kozak del ácido nucleico endógeno. Alternativamente, cuando un UTR 5' que no es endógeno al ácido nucleico de interés está siendo añadida por PCR, tal como se ha descrito anteriormente, se puede rediseñar una secuencia de Kozak mediante la adición de la secuencia 5' UTR. Las secuencias de Kozak pueden aumentar la eficiencia de la traducción de algunas transcripciones de ARN, pero no parecen ser necesarias para que todos los ARN permitan la traducción eficiente. El requisito para secuencias de Kozak para muchos ARNm es conocido en la técnica. En otras realizaciones, la UTR 5' puede ser UTR 5' de un virus de ARN, cuyo genoma de ARN es estable en las células. En otras realizaciones, se pueden utilizar varios análogos de nucleótidos en la UTR 3' o 5' para impedir la degradación por exonucleasa del ARNm.

[0414] Para permitir la síntesis de ARN a partir de una plantilla de ADN sin necesidad de clonación de genes, un promotor de la transcripción debe estar unido a la plantilla de ADN en dirección 5' de la secuencia que se transcribe. Cuando una secuencia que funciona como promotor para una ARN polimerasa se añade al extremo 5' del cebador directo, el promotor de la ARN polimerasa se incorpora en el producto de la PCR en dirección 5' del marco de lectura abierto que se transcribe. En una realización preferida, el promotor es un promotor de T7 polimerasa, tal como se describe en otra parte en el presente documento. Otros promotores útiles incluyen, pero no se limitan a, promotores de T3 y SP6 ARN polimerasa SP6. Las secuencias de nucleótidos de consenso para los promotores T7, T3 y SP6 son conocidas en la técnica.

[0415] En una realización preferida, el ARNm tiene un bloqueador en el extremo 5' y una cola de poli (A) 3' que determinan la unión al ribosoma, la iniciación de la traducción y la estabilidad del ARNm en la célula. En una plantilla de ADN circular, por ejemplo, plásmido de ADN, la ARN polimerasa produce un producto concatemérico largo que no es adecuado para la expresión en células eucariotas. La transcripción del ADN del plásmido linealizado en el extremo de la UTR 3' da lugar a ARNm de tamaño normal que no es eficaz en la transfección eucariota incluso si es poliadenilado después de la transcripción.

[0416] En una plantilla de ADN lineal, la ARN polimerasa de fago T7 puede extender el extremo 3' de la transcripción más allá de la última base de la plantilla (Schenborn y Mierendorf, Nuc Acids Res., 13: 6223-36 (1985); Nacheva y Berzal-Herranz, Eur J. Biochem, 270: 1485-1465 (2003).

[0417] El procedimiento convencional de integración de tramos de poliA/T en una plantilla de ADN es la clonación molecular. Sin embargo, la secuencia poliA/T integrado en el ADN plásmido puede causar inestabilidad del

plásmido, por lo que las plantillas de ADN de plásmidos obtenidas a partir de células bacterianas están a menudo altamente contaminados con deleciones y otras aberraciones. Esto hace que los procedimientos de clonación no sean sólo laboriosos y lentos, sino a menudo no fiables. Esa es la razón por la que un procedimiento que permite la construcción de plantillas de ADN con tramos poliA/T 3' sin clonación es altamente deseable.

[0418] El segmento poliA/T de la plantilla de ADN de la transcripción puede producirse durante la PCR usando un cebador inverso que contiene una cola de poli T, tal como una cola 100T (SEQ ID NO: 35) o después de la PCR mediante cualquier otro procedimiento, incluyendo, pero no limitado a, la ligadura de ADN o en recombinación in vitro. En una realización, la cola de poli (T) es de 50 a 5000 nucleótidos de longitud (SEQ ID NO: 87). Las colas de poli (A) también proporcionan estabilidad a los ARN y reducen su degradación. Generalmente, la longitud de una cola de poli (A) se correlaciona positivamente con la estabilidad del ARN transcrito. En una realización, la cola de poli (A) está entre 100 y 5000 nucleótidos de longitud (SEQ ID NO: 88).

[0419] Las colas de poli (A) de ARN pueden extenderse aún más tras la transcripción in vitro con el uso de una poli (A) polimerasa, tal como poliA polimerasa de E. coli (E-PAP). En una realización, el aumento de la longitud de una cola de poli (A) de 100 nucleótidos a entre 300 y 400 nucleótidos (SEQ ID NO: 38) se traduce en un aumento de dos veces en la eficiencia de traducción del ARN. Además, la unión de diferentes grupos químicos al extremo 3' puede aumentar la estabilidad del ARNm. Dicha unión puede contener nucleótidos modificado/artificiales, aptámeros y otros compuestos. Por ejemplo, los análogos de ATP pueden incorporarse en la cola de poli (A) utilizando poli (A) polimerasa. Los análogos de ATP pueden aumentar aún más la estabilidad del ARN.

[0420] Los bloqueadores 5' también proporcionan estabilidad a las moléculas de ARN. En una realización preferida, los ARN producidos por los procedimientos descritos en el presente documento incluyen un bloqueador 5'. El bloqueador 5' se proporciona usando técnicas conocidas en el sector y descritas en el presente documento (Cougot, et al, Trends in Biochem Sci, 29: 436-444 (2001); Stepinski, et al, RNA, 7: 1468-95 (2001); Elango, et al, Biochim Biophys Res Commun, 330: 958-966 (2005)).

[0421] Los ARN producidos por los procedimientos descritos en el presente documento también pueden contener la secuencia de un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES). La secuencia de IRES puede ser cualquier secuencia viral, cromosómica o diseñada artificialmente que inicia la unión a ARNm del ribosoma independiente del bloqueador y facilita la iniciación de la traducción. Puede incluirse cualquier soluto adecuado para la electroporación de células, que pueden contener factores que facilitan la permeabilidad celular y la viabilidad, tales como azúcares, péptidos, lípidos, proteínas, antioxidantes, y agentes tensioactivos.

[0422] Hay varias ventajas de los procedimientos de transfección de ARN de la presente descripción. Por ejemplo, la transfección de ARN es esencialmente transitoria y libre de vectores. Un transgén de ARN puede suministrarse a un linfocito y expresarse en el smimo después de una breve activación de células in vitro, como un casete de expresión mínimo sin la necesidad de ninguna secuencia viral adicional. En estas condiciones, la integración del transgén en el genoma de la célula huésped es poco probable. La clonación de células no es necesaria debido a la eficiencia de transfección del ARN y su capacidad para modificar de manera uniforme a toda la población de linfocitos. Además, la expresión de genes de una fuente de ARN no requiere la transcripción y el producto proteico se produce rápidamente después de la transfección. Puesto que el ARN tiene sólo que ganar el acceso al citoplasma, en lugar del núcleo, los procedimientos de transfección típicos dan lugar a una velocidad extremadamente alta de la transfección.

[0423] El ARN se puede introducir en células diana usando cualquiera de una serie de diferentes procedimientos, por ejemplo, los procedimientos disponibles en el mercado, que incluyen, pero no se limitan a, electroporación (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Colonia, Alemania)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) o el Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator (Eppendort, Hamburg Alemania), transfección mediada por liposomas catiónicos utilizando lipofección, encapsulación de polímero, transfección mediada por péptidos o sistemas de suministro de partículas biolísticas, tales como "pistolas de genes" (véase, por ejemplo, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther, 12 (8): 861-70 (2001).

PROCEDIMIENTOS NO VIRALES DE SUMINISTRO

[**0424**] En algunos aspectos, se pueden utilizar procedimientos no virales para suministrar un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en el presente documento a una célula o tejido o un sujeto.

[0425] En algunos casos, el procedimiento no viral incluye el uso de un transposón (también llamado un elemento transponible). En algunos casos, un transposón es un trozo de ADN que puede insertarse en una ubicación en un genoma, por ejemplo, un trozo de ADN que es capaz de autoreplicarse e insertar su copia en un genoma, o un trozo de ADN que se puede empalmar con un ácido nucleico más largo e insertarse en otro lugar en un genoma. Por ejemplo, un transposón comprende una secuencia de ADN compuesta de repeticiones invertidas que flanquean los genes de transposición.

[0426] Los procedimientos de ejemplo de suministro de ácido nucleico utilizando un transposón incluyen un

sistema de transposones Sleeping Beauty (SBTS) y un sistema de transposones piggyBac (PB). Véase, por ejemplo, Aronovich et al. Tararear. Mol. Gineta. 20.R1 (2011): R14-20; Singh et al. Cancer Res. 15 (2008): 2961-2971; Huang et al. Mol. Ther. 16 (2008): 580-589; Grabundzija et al. Mol. Ther. 18 (2010): 1200-1209; Kebriaei et al. Blood. 122,21 (2013): 166; Williams. Molecular Therapy 16.9 (2008): 1515-1516; Bell et al. Nat. Protoc. 2.12 (2007): 3153-65; y Ding et al. Cell. 122,3 (2005): 473-83.

[0427] El SBTS incluye dos componentes: 1) un transposón que contiene un transgén y 2) una fuente de enzima transposasa. La transposasa puede transponer el transposón desde un plásmido portador (u otro ADN donante) a un ADN diana, tal como un cromosoma/genoma de la célula huésped. Por ejemplo, la transposasa se une al plásmido portador/ADN donante, corta el transposón (incluyendo un transgén o transgenes) fuera del plásmido, y lo inserta en el genoma de la célula huésped. Véase, por ejemplo, Aronovich et al. supra.

[0428] Los ejemplos de transposones incluyen un transposón basado en pT2. Véase, por ejemplo, Grabundzija et al. Nucleic Acids Res. 41.3 (2013): 1829-1847; y Singh et al. Cancer Res. 68.8 (2008): 2961-2971. Las transposasas de ejemplo incluyen una transposasa de tipo Tc1/mariner, por ejemplo, la transposasa SB10 o la transposasa SB11 (una transposasa hiperactiva que se puede expresar, por ejemplo, a partir de un promotor de citomegalovirus). Véase, por ejemplo, Aronovich et al.; Kebriaei et al.; y Grabundzija et al.

[0429] El uso de SBTS permite la integración y la expresión eficiente de un transgén, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en el presente documento. En el presente documento se proporcionan procedimientos de generación de una célula, por ejemplo, célula T o célula NK, que expresa de manera estable un CAR descrito en el presente documento, por ejemplo, usando un sistema de transposón, tal como SBTS.

[0430] De acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento, en algunos casos, uno o más ácidos nucleicos, por ejemplo, plásmidos, que contienen los componentes SBTS se suministran a una célula (por ejemplo, célula T o célula NK). Por ejemplo, el ácido o ácidos nucleicos se suministran mediante procedimientos estándar de suministro de ácido nucleico (por ejemplo, ADN de plásmido), por ejemplo, los procedimientos descritos en el presente documento, por ejemplo, electroporación, transfección o lipofección. En algunos casos, el ácido nucleico contiene un transposón que comprende un transgén, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en el presente documento. En algunos casos, el ácido nucleico contiene un transposón que comprende un transgén (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un CAR que se describe en el presente documento), así como una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima transposasa. En otros casos, se proporciona un sistema con dos ácidos nucleicos, por ejemplo, un sistema de doble plásmido, por ejemplo, donde un primer plásmido contiene un transposón que comprende un transgén y un segundo plásmido contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima transposasa. Por ejemplo, el primer y el segundo ácidos nucleicos son cosuministrados en una célula huésped.

[0431] En algunos casos, se generan células, por ejemplo, células T o NK, que expresan un CAR descrito en el presente documento mediante el uso de una combinación de inserción de genes utilizando el SBTS y la edición genética utilizando una nucleasa (por ejemplo, dedo de zinc nucleasas (ZFNs), nucleasas efectoras del tipo activador de la transcripción (TALENS), el sistema CRISPR/Cas, o endonucleasas de conducción remodificadas con meganucleasa modificada).

[0432] En algunos casos, el uso de un procedimiento no viral de suministro permite la reprogramación de células, por ejemplo, las células T o NK, y la infusión directa de las células en un sujeto. Las ventajas de vectores no virales incluyen, pero no se limitan a, la facilidad y coste relativamente bajo de producir cantidades suficientes requeridas para satisfacer una población de pacientes, la estabilidad durante el almacenamiento y la falta de inmunogenicidad.

CÉLULAS EFECTORAS INMUNITARIAS, POR EJEMPLO, CÉLULAS T

[0433] Los procedimientos descritos en el presente documento proporcionan células CD4+ que tienen un CAR^{CD4+} y células T CD8+ que tienen un CAR^{CD8+}, en los que el CAR^{CD4+} y CAR^{CD8+} se diferencian entre sí. Las células T se pueden obtener mediante una variedad de procedimientos de una variedad de fuentes, por ejemplo, tal como se describe en la sección de este documento titulada "**FUENTES DE CÉLULAS**". Puede ser deseable tener poblaciones separadas de células T CD4+ y CD8+ para los procedimientos descritos en el presente documento. Las preparaciones de células T CD4+ y preparaciones de CD8+ se pueden obtener mediante una variedad de procedimientos, por ejemplo, tal como se describe en la sección de este documento titulada "**SEPARACIÓN DE LAS CÉLULAS T**". Las células T se transforman con los CAR y se expanden. Las células CD4+ que tienen un CAR^{CD4+} y células CD8+ que tienen un CAR^{CD8+} se pueden expandir mediante una variedad de procedimientos, por ejemplo, procedimientos descritos en la sección de este documento titulada "**ACTIVACIÓN Y EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS T**". Las células T CD4+ pueden polrizarse por Th17. Las células CD4+ polarizadas por Th17 que tienen un CAR^{CD4+} se pueden polarizar y expandir mediante una variedad de procedimientos, por ejemplo, procedimientos descritos en la sección de este documento titulada "**ACTIVACIÓN Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS TH17**". Las células T CD4+, células T CD8+ y células Th17 pueden ser transformadas mediante una variedad de procedimientos, por ejemplo, procedimientos descritos en la sección de este documento titulada "**CONSTRUCCIONES DE ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICAN UN CAR.**"

FUENTES DE CÉLULAS

[0434] En los ejemplos, antes de la expansión y la modificación genética u otra modificación, se puede obtener una fuente de células, por ejemplo, células T o células asesinas naturales (NK), de un sujeto. Ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, monos, chimpancés, perros, gatos, ratones, ratas, y especies transgénicas de los mismos. Las células T pueden obtenerse de un número de fuentes, incluyendo las células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglio linfático, sangre del cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido de bazo y tumores.

[0435] En los ejemplos, las células efectoras inmunitarias, por ejemplo, las células T, se pueden obtener de una unidad de sangre recogida de un sujeto usando cualquier número de técnicas conocidas por el experto en la técnica, tales como separación de Ficoll™. En una realización, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen mediante aféresis. El producto de aféresis típicamente contiene linfocitos, incluyendo las células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En un ejemplo, las células recogidas por aféresis pueden lavarse para extraer la fracción de plasma y, opcionalmente, colocar las células en un tampón apropiado o medios para las etapas de procesamiento posteriores. En un ejemplo, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En un ejemplo alternativo, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no todos, los cationes divalentes. Sorprendentemente, las etapas de activación inicial en ausencia de calcio conducen a la activación de la señal ampliada. Una etapa de lavado puede llevarse a cabo mediante procedimientos conocidos para aquellos en la técnica, tal como mediante el uso de una centrífuga semi-automatizada de "flujo a través" (por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, la Baxter CytoMate, o la Haemonetics Cell Saver 5) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células se pueden resuspender en una variedad de tampones biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS libres de Ca, libre de Mg, Plasmalyte A, u otra solución de solución salina con o sin tampón. Alternativamente, los componentes no deseados de la muestra de aféresis pueden eliminarse y las células se resuspenden directamente en medios de cultivo.

[0436] Se reconoce que los procedimientos de la solicitud pueden utilizar condiciones de medios de cultivo que comprende 5% o menos, por ejemplo 2%, de suero AB humano, y emplean condiciones y composiciones de medios de cultivo conocidas, por ejemplo las descritas en Smith et al., "Ex vivo expansión of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement" Clinical & Translational Immunology (2015) 4, e31; doi: 10.1038/cti.2014.31.

[0437] En un ejemplo, las células T se aíslan a partir de linfocitos de sangre periférica mediante la lisis de glóbulos rojos y el agotamiento de los monocitos, por ejemplo, por centrifugación a través de un gradiente Percoll™ o mediante elutriación centrífuga a contracorriente. Una subpoblación específica de células T, tales como células T CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ y CD45RO+, se puede aislar adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa.

[0438] Pueden utilizarse líneas de células T disponibles en la técnica.

SEPARACIÓN DE LAS CÉLULAS T

[0439] Los procedimientos descritos en el presente documento proporcionan células CD4+ que tienen un CAR^{CD4+} y células CD8+ que tienen un CAR^{CD8+}, en los que un CAR^{CD4+} y un CAR^{CD8+} se diferencian entre sí. Puede ser deseable tener poblaciones separadas de células T CD4+ y CD8+ para estos procedimientos.

[0440] En un ejemplo, una célula T CD4+ o una población de células T CD4+ se aislan mediante selección positiva. Por ejemplo, las células T aisladas de la sangre de un sujeto se pueden incubar con un anticuerpo que reconoce específicamente CD4 bajo condiciones adecuadas para el marcaje de anticuerpos de las células T CD4+. Los anticuerpos que reconocen específicamente CD4 son conocidos en la técnica, por ejemplo, el clon de anticuerpo anti-CD4 M-T466 (Miltenyi Biotech), clon de anticuerpo anti-CD4 OKT4 (Affymetrix). En un ejemplo, el anticuerpo anti-CD4 se conjuga con una molécula fluorescente, por ejemplo, FITC, y las células T se clasifican usando citometría de flujo para separar las células T que expresan CD4 de células T que no expresan CD4, por ejemplo, célula T CD8+. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD4 se conjuga con una superficie o un soporte sólido, por ejemplo, una perla magnética, y las células CD4+ pueden aislarse usando procedimientos de cromatografía conocidas en la técnica.

[0441] Una célula T CD4+ o una población de células T CD4+ también se pueden enriquecer mediante selección negativa. En un ejemplo, se utiliza un cóctel de anticuerpos que incluye anticuerpos contra marcadores que están presentes en células que no expresan CD4, por ejemplo, CD8, CD16, CD19, CD36, CD56, CD66b, TCRγ/δ, y glicoforina A. El cóctel de anticuerpos se añade a la muestra de células de la sangre, se mezcla, y se incuba, por ejemplo, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Un medio de densidad se coloca en capa sobre la muestra y la mezcla se centrifuga. Las células enriquecidas que expresan CD4+ estarán presentes en la interfase del plasma y el medio de densidad y se pueden aislar. Las células no deseadas, por ejemplo, las células que no expresan CD4,

se encuentran en la parte inferior del tubo, por ejemplo, por debajo del medio de densidad. En otro caso, el cóctel de anticuerpos puede conjugarse a una superficie o una perla, y las células CD4+ se pueden recoger del flujo sobre la superficie o perla, mientras que las células no deseadas que no expresan CD4 se inmovilizan sobre la superficie o perla. En otro caso, el cóctel de anticuerpos monoclonales incluye anticuerpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8.

[0442] En un ejemplo, una célula T CD8+ o una población de células T CD8+ se aislan mediante selección positiva. Por ejemplo, las células T aisladas de la sangre de un sujeto se pueden incubar con un anticuerpo que reconoce específicamente CD8 bajo condiciones adecuadas para el marcaje de anticuerpos de las células T CD8+. Los anticuerpos que reconocen específicamente CD8 son conocidos en la técnica, por ejemplo, clon OKT8 del anticuerpo anti-CD8 (Affymetrix), clon C8/144B del anticuerpo anti-CD8 (Dako). En un caso, el anticuerpo anti-CD8 se conjuga con una molécula fluorescente, por ejemplo, FITC, y las células T se clasifican usando citometría de flujo para separar las células T que expresan CD8 de células T que no expresan CD8, por ejemplo, células T CD4+. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD8 se conjuga con una superficie o un soporte sólido, por ejemplo, una perla magnética, y las células CD8+ puede aislarse usando procedimientos de cromatografía conocidas en la técnica.

[0443] Una célula T CD8+ o una población de células T CD8+ también se pueden enriquecer mediante selección negativa. En un ejemplo, se utiliza un cóctel de anticuerpos que incluye anticuerpos contra marcadores que están presentes en células que no expresan CD8, por ejemplo, anticuerpos contra CD4, CD16, CD19, CD36, CD56, CD66b, TCRγ/δ. El cóctel de anticuerpos se añade a la muestra de células de la sangre, se mezcla, y se incuba, por ejemplo, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Un medio de densidad se coloca en capa sobre la muestra y la mezcla se centrifuga. Las células enriquecidas que expresan CD8+ estarán presentes en la interfase del plasma y el medio de densidad y se pueden aislar. Las células no deseadas, por ejemplo, las células que no expresan CD8, se encuentran en la parte inferior del tubo, por ejemplo, por debajo del medio de densidad. En otro caso, el cóctel de anticuerpos puede conjugarse a una superficie o una perla, y las células CD8+ se pueden recoger del flujo sobre la superficie o perla, mientras que las células no deseadas que no expresan CD8 se inmovilizan sobre la superficie o perla.

[0444] Los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir, por ejemplo, la selección de una subpoblación específica de células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T, por ejemplo, células T CD4+ y/o CD8 +, que son una población agotada de células T reguladoras, células agotadas en CD25+, utilizando, por ejemplo, una técnica de selección negativa, por ejemplo, descrita en el presente documento. Preferiblemente, la población de células agotadas en T reguladoras contiene menos de 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% de células CD25+.

[**0445]** En un ejemplo, las células T reguladoras, por ejemplo, las células T CD25+ se extraen de la población usando un anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, o un ligando de unión a CD25, IL-2. En un ejemplo, el anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, o ligando de unión a CD25, está conjugado a un sustrato, por ejemplo, una perla, o en cualquiera caso, se recubre recubre un sustrato, por ejemplo, una perla. En un ejemplo, el anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, está conjugado a un sustrato como se describe en el presente document.

[0446] En un ejemplo, las células T reguladoras, por ejemplo, las células T CD25+, se extraen de la población que usando reactivo de agotamiento CD25 de Miltenyi™. En un ejemplo, la proporción de células con respecto al reactivo de agotamiento CD25 es 1e7 células a 20 uL, o 1e7 células a 15 uL, o 1e7 células a 10 uL, o 1e7 células a 5 uL, o 1e7 células a 2,5 uL, o 1e7 células a 1,25 uL. En un ejemplo, por ejemplo, para las células T reguladoras, por ejemplo, el se utiliza un agotamiento de CD25+, mayor de 500 millones de células/ml. En un aspecto adicional, se usa una concentración de células de 600, 700, 800, o 900 millones de células/ml.

[0447] En un ejemplo, la población de células efectoras inmunitarias a agotarse incluye aproximadamente 6 x 10^9 células T CD25+. En otros aspectos, la población de células efectoras inmunitarias a agotarse incluyen de aproximadamente 1 x 10^9 a 1x 10^{10} células T CD25, y cualquier valor entero en el medio. En un ejemplo, las células T agotadas reguladoras de la población resultante tienen 2 x 10^9 células T reguladoras, por ejemplo, células CD25+, o menos (por ejemplo, 1 x 10^9, 5 x 10^8, 1 x 10^8, 5 x 10^7, 1 x 10^7 o menos células CD25+).

[0448] En un ejemplo, las células T reguladoras, por ejemplo, células CD25+, se extraen de la población usando el sistema CliniMAC con un conjunto de tubos de agotamiento, tales como, por ejemplo, el tubo 162-01. En un ejemplo, el sistema CliniMAC se ejecuta en un entorno de agotamiento, tal como, por ejemplo, DEPLETION2.1.

[0449] Sin desear estar ligado por una teoría particular, disminuyendo el nivel de reguladores negativos de las células inmunitarias (por ejemplo, disminuyendo el número de células inmunitarias no deseadas, por ejemplo, células T_{REG}), en un sujeto antes de la aféresis o durante la fabricación de un producto de células que expresan CAR, se puede reducir el riesgo de recaída del sujeto. Por ejemplo, los procedimientos de agotamiento de células T_{REG} son conocidos en la técnica. Los procedimientos de la disminución de células T_{REG} incluyen, pero no se limitan a, ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR (un anticuerpo anti-GITR descrito en el presente documento), agotamiento de

CD25 y combinaciones de los mismos.

[0450] En algunos casos, los procedimientos de fabricación comprenden la reducción del número de (por ejemplo, agotamiento) células T_{REG} antes de la fabricación de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, los procedimientos de fabricación comprenden poner en contacto la muestra, por ejemplo, la muestra de aféresis, con un anticuerpo anti-GITR y/o un anticuerpo anti-CD25 (o un fragmento del mismo, o un ligando de unión a CD25), por ejemplo, para agotar las células T_{REG} antes de la fabricación del producto celular que expresa CAR (por ejemplo, células T, células NK).

[0451] En algunos casos, los procedimientos de fabricación comprenden la reducción del número de (por ejemplo, agotamiento) de células T_{REG} antes de la fabricación de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, los procedimientos de fabricación comprenden poner en contacto la muestra, por ejemplo, la muestra de aféresis, con un anticuerpo anti-GITR y/o un anticuerpo anti-CD25 (o un fragmento del mismo, o un ligando de unión a CD25), por ejemplo, para agotar las células T_{REG} antes de la fabricación del producto celular que expresa CAR (por ejemplo, células T, células NK) producto.

[0452] En un caso, un sujeto es pre-tratado con una o más terapias que reducen las células T_{REG} antes de la recogida de células para la fabricación de productos celulares que expresan CAR, reduciendo así el riesgo del sujeto de una recaída en el tratamiento con células que expresan CAR. En un caso, los procedimientos de disminución de células T_{REG} incluyen, pero no se limitan a, la administración al sujeto de uno o más de ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, agotamiento de CD25 o una combinación de los mismos. La administración de uno o más de ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, agotamiento de CD25 o una combinación de los mismos, puede tener lugar antes, durante o después de una infusión del producto celular que expresa CAR.

[0453] En un caso, un sujeto es pre-tratado con ciclofosfamida antes de la recogida de células para la fabricación de productos celulares que expresan CAR, reduciendo así el riesgo de recaída de un sujeto en el tratamiento con células que expresan CAR. En un ejemplo, un sujeto se pre-trata con un anticuerpo anti-GITR antes de la recogida de células para la fabricación de productos celulares que expresan CAR, reduciendo así el riesgo de recaída de un sujeto en el tratamiento con células que expresan CAR.

[0454] En un caso, la población de células a eliminar no son ni las células T reguladoras ni células tumorales, sino células que en cualquier caso afectan negativamente a la expansión y/o función de las células CART, por ejemplo, células que expresan CD14, CD11b, CD33, CD15 u otros marcadores expresados por células supresoras potencialmente inmunes. En un ejemplo, dichas células se contemplan que se eliminan simultáneamente con las células T reguladoras y/o células tumorales, o después de dicho agotamiento, o en otro orden.

[0455] Los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir más de una etapa de selección, por ejemplo, más de una etapa de agotamiento. El enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa se puede lograr, por ejemplo, con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente. Un procedimiento es la clasificación y/o la selección celular a través de inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presente en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4+ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales puede incluir anticuerpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8.

[0456] Los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir además la eliminación de células de la población que expresa un antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno tumoral que no comprende CD25, por ejemplo, CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 o CD11b, para de ese modo proporcionar una población de células agotada en T reguladora, por ejemplo, agotada en CD25+, y células agotadas en antígeno tumoral, que son adecuados para la expresión de un CAR, por ejemplo, un CAR descrito en el presente documento. En un ejemplo, las células que expresan un antígeno tumoral se eliminan simultáneamente con las T reguladoras, por ejemplo, células CD25+. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, y un anticuerpo anti-antígeno tumoral, o fragmento del mismo, puede estar unido al mismo sustrato, por ejemplo, perlas, que puede ser utilizado para eliminar las células o un anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, o el anticuerpo anti-antígeno tumoral, o fragmento del mismo, puede estar unido a perlas separadas, una mezcla de lo cual se puede utilizar para eliminar las células. En otros casos, la eliminación de células T reguladoras, por ejemplo, células CD25+, y la eliminación de células que expresan el antígeno tumoral secuencial, y puede tener lugar, por ejemplo, en cualquier orden.

[0457] También se proporcionan procedimientos que incluyen la eliminación de células de la población que expresa un inhibidor de punto de control, por ejemplo, un inhibidor de punto de control descrito en el presente documento, por ejemplo, uno o más de células PD1+, células LAG3+ y células TIM3+, para proporcionar así una población de células agotadas en T reguladoras, por ejemplo, agotadas en CD25+, y células agotadas en el inhibidor de punto de control, por ejemplo, células agotadas en PD1+, LAG3+ y/o TIM3+. Los inhibidores de punto de control de ejemplo incluyen PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 , CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, Gal9, adenosina, y TGFR beta. En un

caso, las células que expresan el inhibidor de punto de control se eliminan simultáneamente con las células T reguladoras, por ejemplo, células CD25+. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, y un anticuerpo anti-inhibidor de punto de control, o fragmento del mismo, pueden estar unidos a la misma perla que se puede utilizar para eliminar las células, o un anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, y el anticuerpo anti-inhibidor de punto de control, o fragmento del mismo, se pueden unir a perlas separadas, una mezcla de las cuales se puede utilizar para eliminar las células. En otros casos, la eliminación de células T reguladoras, por ejemplo, células CD25+ y la eliminación de las células que expresan el inhibidor de punto de control es secuencial, y puede tener lugar, por ejemplo, en cualquier orden.

[0458] Los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir una etapa de selección positiva. Por ejemplo, las células T (por ejemplo, células T CD4+ o células T CD8+) se pueden aislar mediante incubación con perlas conjugadas a anti-CD3/anti-CD28 (por ejemplo, 3x28), tales como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, durante un período de tiempo suficiente para la selección positiva de las células T deseadas. En un ejemplo, el período de tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En un ejemplo adicional, el período de tiempo varía de 30 minutos a 36 horas o más y todos los valores enteros entre ellos. En un ejemplo adicional, el período de tiempo es de al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 horas. En otro caso adicional, el período de tiempo es de 10 a 24 horas, por ejemplo, 24 horas. Se puedne utilizar tiempos de incubación más largos para aislar células T en cualquier situación donde haya pocas células T en comparación con otros tipos de células, tal como en el aislamiento de los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) de tejido tumoral o de individuos inmunocomprometidos. Además, el uso de tiempos de incubación más largos puede aumentar la eficacia de la captura de las células T CD8+. Por lo tanto, simplemente acortando o alargando el tiempo se permite que las células T se unan a las perlas CD3/CD28 y/o aumentando o disminuyendo la relación de perlas con respecto a las células T (tal como se describe adicionalmente en el presente documento), se pueden seleccionar preferentemente subpoblaciones de células T a favor o en contra en el inicio del cultivo o en otros puntos de tiempo durante el proceso. Además, aumentando o disminuyendo la relación de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 en las perlas u otra superficie, las subpoblaciones de células T se pueden seleccionar preferentemente a favor o en contra al inicio del cultivo o en otros puntos de tiempo deseados.

[0459] En un ejemplo, una población de células T (por ejemplo, células T, tales como las células T CD4+ o las células T CD8+) se pueden seleccionar que expresen uno o más de IFN-γ, TNF, IL-17A, IL-2, IL -3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, granzima B, y perforina, u otras moléculas apropiadas, por ejemplo, otras citocinas. Los procedimientos para el cribado de la expresión de células se pueden determinar, por ejemplo, mediante los procedimientos descritos en la publicación PCT No.: WO 2013/126712.

[0460] Para el aislamiento de una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, la concentración de células y la superficie (por ejemplo, partículas tales como perlas) se puede variar. En ciertos casos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que las perlas y las células están mezcladas (es decir, aumento de la concentración de células), para asegurar el contacto máximo de las células y las perlas. En un ejemplo, se utiliza una concentración de 10 mil millones de células/ml, 9 mil millones/ml, 8 mil millones/ml, 7 mil millones/ml, 6 mil millones/ml, o 5 mil millones/ml. En un ejemplo, se utiliza una concentración de mil millones de células/ml. En un ejemplo adicional, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En un ejemplo adicional, se usa una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 millones de células/ml. En otro caso adicional, se usa una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95, o 100 millones de células/ml. En otros casos, se pueden usar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de concentraciones altas puede provocar un aumento del rendimiento celular, activación celular y la expansión de células. Además, el uso de concentraciones celulares elevadas permite la captura más eficaz de células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, tales como células T negativas de CD28, o de muestras en las que hay muchas células tumorales presentes (es decir, sangre leucémica, tejido tumoral, etc...). Tales poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y serían deseables de obtener. Por ejemplo, utilizando una alta concentración de células de permite una selección más eficaz de células T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

[0461] En un ejemplo relacionado, puede ser deseable usar concentraciones inferiores de células. Al diluir significativamente la mezcla de las células T y la superficie (por ejemplo, partículas, tales como perlas), las interacciones entre las partículas y las células se reduce al mínimo. Esto selecciona células que expresan grandes cantidades de antígenos deseados a unir a las partículas. Por ejemplo, las células T CD4+ expresan mayores niveles de CD28 y son capturadas de manera más eficiente que las células T CD8+ en concentraciones diluidas. En un ejemplo, la concentración de células utilizada es de 5×10^6/ml. En otros casos, la concentración usada puede ser de aproximadamente 1×10^5/ml a 1×10^6/ml, y cualquier valor entero en el medio. En otros casos, las células se pueden incubar en un rotador durante distintos períodos de tiempo a distintas velocidades a 2-10 °C o a temperatura ambiente.

[**0462**] Las células T para la estimulación también se pueden congelar después de una etapa de lavado. Sin desear estar ligado por la teoría, la etapa de congelación y posterior descongelación proporciona un producto más uniforme mediante la eliminación de los granulocitos y, en cierto grado, monocitos, en la población celular. Después de la etapa de lavado que elimina el plasma y las plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución de congelación. Aunque muchas soluciones de congelación y parámetros son conocidos en la técnica y serán útiles en este contexto, un procedimiento implica el uso de PBS que contenía 20% de DMSO y 8% de albúmina de suero

humano, o medios de cultivo que contienen 10% de dextrano 40 y 5% de dextrosa, 20% albúmina de suero humano y 7,5% de DMSO, o 31,25% Plasmalyte-A, 31,25% de dextrosa 5%, 0,45% de NaCl, 10% de dextrano 40 y 5% de dextrosa, 20% albúmina de suero humano, y 7,5% de DMSO o de otros medios de congelación celular adecuados que contienen, por ejemplo, Hespan y Plasmalyte a, a continuación, las células se congelan a -80 °C a una velocidad de 1 ° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se pueden utilizar otros procedimientos de congelación controlada, así como la congelación no controlada inmediatamente a -20 ° C o en nitrógeno líquido.

[0463] En ciertos casos, las células crioconservadas se descongelan y se lavan tal como se describe en el presente documento y se les permite reposar durante una hora a temperatura ambiente antes de la activación usando los procedimientos descritos en el presente documento.

[0464] En un ejemplo, la recogida de muestras de sangre o producto de aféresis de un sujeto se realiza en un período de tiempo antes de cuando podrían ser necesarias las células expandidas. Como tal, la fuente de las células para ser expandidas se puede recoger en cualquier punto de tiempo necesario, y las células deseadas, tales como células T, se aislan y se congelan para posterior uso en, por ejemplo, terapia con células T para cualquier conjunto de enfermedades o condiciones que se beneficiarían de dicha terapia con células T. En un ejemplo, una muestra de sangre o una aféresis se toma de un sujeto generalmente sano. En ciertos casos, una muestra de sangre o un aféresis se tomada de un sujeto generalmente sano que está en riesgo de desarrollar una enfermedad, pero que aún no se ha desarrollado dicha enfermedad, y se aíslan las células de interés y se congelan para su uso posterior. En ciertos casos, las células T pueden expandirse, congeladrse y se utilizan en un momento posterior. En ciertos casos, las muestras se recogen de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad en particular, pero antes de cualquier tratamiento. En un ejemplo adicional, las células se aíslan de una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto antes de cualquier número de modalidades de tratamiento pertinentes, incluyendo, pero no limitado a, el tratamiento con agentes, tales como natalizumab, efalizumab, agentes antivirales, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos, u otros agentes immunoablativos, tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, Cytoxan, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228 y radiación. Estos fármacos inhiben la fosfatasa calcineurina dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la p70S6 quinasa que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina). (Liu et al, Cell 66: 807-815, 1991; Henderson et al, Immun., 73: 316-321, 1991; Bierer et al, Curr Opin Immun. 5: 763-773, 1993). En un ejemplo adicional, las células se aíslan de un paciente y se congelan para su posterior uso en conjunción con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después de) trasplante de médula ósea o células madre, la terapia ablativa de células T utilizando agentes de quimioterapia, tales como, fludarabina, terapia de radiación de haces externos (XRT), ciclofosfamida, o anticuerpos, tales como OKT3 o CAMPATH. En un ejemplo, las células se aíslan antes y pueden ser congeladas para su uso posterior para el tratamiento después de la terapia ablativa de células B, tales como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan.

[0465] En un ejemplo adicional, las células T se obtienen de un paciente directamente después del tratamiento que deja al sujeto con células T funcionales. En este sentido, se ha observado que después de ciertos tratamientos de cáncer, en particular tratamientos con fármacos que dañan el sistema inmunitario, poco después del tratamiento durante el período en que los pacientes normalmente se recuperan del tratamiento, la calidad de las células T obtenidas puede ser óptima o mejorada por su capacidad para expandirse ex vivo. Del mismo modo, después de la manipulación ex vivo utilizando los procedimientos descritos en el presente documento, estas células pueden estar en un estado preferido para el injerto mejorado y la expansión in vivo. Por lo tanto, se contempla dentro del contexto de la presente descripción la recogida de sangre, que incluye células T, células dendríticas u otras células del linaje hematopoyético, durante esta fase de recuperación. Además, en ciertos casos, la movilización (por ejemplo, movilización con GM-CSF) y regímenes de acondicionamiento se pueden utilizar para crear una condición en un sujeto en el que la repoblación, la recirculación, la regeneración y/o expansión de tipos de células particulares se favorece, especialmente durante una ventana de tiempo definida después de la terapia. Los tipos celulares ilustrativos incluyen células T, células B, células dendríticas y otras células del sistema inmunitario.

[0466] En un ejemplo, las células efectoras inmunitarias que expresan una molécula de CAR, por ejemplo, una molécula de CAR descrita en el presente documento, se obtienen de un sujeto que ha recibido una dosis baja, que aumenta la inmunidad, de un inhibidor de mTOR. En un ejemplo, la población de células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T, a modificar genéticamente para expresar un CAR, se recogen después de un tiempo suficiente, o después de una dosificación suficiente de la dosis baja, que aumenta la inmunidad, de un inhibidor de mTOR, de manera que el nivel de células efectoras inmunitarias negativas de PD1, por ejemplo, células T, o la relación de células efectoras inmnitarias negativas de PD1, por ejemplo, células T/células efectoras inmunitarias positivas de PD1, por ejemplo, células T, en el sujeto o recogidas del sujeto ha aumentado, al menos transitoriamente.

[0467] En otro ejemplo, una población de células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T, que tienen, o serán modificadas genéticamente para expresar un CAR, se pueden tratar ex vivo por contacto con una cantidad de un inhibidor de mTOR que aumenta el número de células efectoras inmunitarias negativas de PD1, por ejemplo, células T o aumenta la proporción de células efectoras inmunitarias negativas de PD1, por ejemplo, células T/ células efectoras inmunitarias positivas de PD1, por ejemplo, células T.

[0468] En un ejemplo, una población de células T es deficiente en diaglicerol quinasa (DGK). Las células deficientes en DGK incluyen células que no expresan ARN o proteína de DGK, o tienen una actividad de DGK inhibida o reducida. Las células deficientes en DGK se pueden generar mediante procedimientos genéticos, por ejemplo, la administración de agentes que interfieren en ARN, por ejemplo, siARN, shARN, miARN, para reducir o prevenir la expresión de DGK. Alternativamente, las células deficientes de DGK pueden generarse mediante el tratamiento con inhibidores de DGK descritos en el presente documento.

[0469] En un ejemplo, una población de células T es deficiente en Ikaros. Las células deficientes en Ikaros incluyen células que no expresan ARN o proteína de Ikaros, o tienen una actividad de Ikaros inhibida o reducida. Las células deficientes en Ikaros se pueden generar mediante procedimientos genéticos, por ejemplo, la administración de agentes que interfieren en ARN, por ejemplo, siARN, shARN, miARN, para reducir o prevenir la expresión de Ikaros. Alternativamente, las células deficientes de Ikaros pueden generarse mediante el tratamiento con inhibidores de Ikaros, por ejemplo, lenalidomida.

[0470] En los ejemplos, una población de células T es deficiente de DGK y deficiente de Ikaros, por ejemplo, no expresa DGK e Ikaros, o ha reducido o inhibido la actividad DGK e Ikaros. Dichas células deficientes de DGK e Ikaros pueden ser generadas mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

[0471] En un ejemplo, las células NK se obtienen del sujeto. En otro ejemplo, las células NK son una línea de células NK, por ejemplo, línea celular NK-92 (Conkwest).

CAR ALOGÉNICO

[0472] En los ejemplos descritos en el presente documento, la célula efectora inmunitaria (por ejemplo, una célula T, tal como una célula T CD4+ o una célula T CD8+) puede ser una célula efectora inmunitaria alogénica, por ejemplo, células T o células NK. Por ejemplo, la célula puede ser una célula T alogénica, por ejemplo, una célula T alogénica que carece de expresión de un receptor de células T funcional (TCR) y/o antígeno leucocitario humano (HLA), por ejemplo, HLA de clase I y/o HLA clase II.

[0473] Una célula T que carece de un TCR funcional puede ser, por ejemplo, diseñada de tal manera que no expresa ningún TCR funcional en su superficie, diseñado de tal manera que no expresa una o más subunidades que comprenden un TCR funcional (por ejemplo, diseñada de tal manera que no expresa (o muestra una expresión reducida) de TCR alfa, TCR beta, TCR gamma, TCR delta, TCR epsilon, y/o TCR zeta) o diseñada de tal manera que produce TCR muy poco funcional en su superficie. Alternativamente, la célula T puede expresar un TCR deteriorado sustancialmente, por ejemplo, mediante la expresión de formas mutadas o truncadas de una o más de las subunidades de la TCR. El término "TCR sustancialmente dañadao" significa que este TCR no provocará una reacción inmunitaria adversa en un huésped.

[0474] Una célula T descrita en el presente documento puede, por ejemplo, diseñarse de tal manera que no expresa un HLA funcional en su superficie. Por ejemplo, una célula T descrita en el presente documento, se puede diseñar de tal manera que expresión en la superficie celular de HLA, por ejemplo, HLA de clase 1 y/o HLA clase II, se regula por disminución. En algunos casos, la regulación por disminución de HLA se puede lograr mediante la reducción o eliminación de la expresión de beta-2 microglobulina (B2M).

[0475] En algunos casos, la célula T puede carecer de un TCR funcional y un HLA funcional, por ejemplo, HLA de clase I y/o HLA de clase II.

[0476] Las células T modificadas que carecen de la expresión de un TCR funcional y/o un HLA funcional se pueden obtener por cualquier medio adecuado, incluyendo un knock out o knock down de una o más subunidades de TCR o HLA. Por ejemplo, la célula T puede incluir un knock down de TCR y/o HLA usando siARN, shARN,), nucleasa efectora similar a activador de la transcripción (TALEN), o endonucleasa de dedos de zinc (ZFN).

[0477] En algunas realizaciones, la célula alogénica puede ser una célula que no expresa o expresa a niveles bajos una molécula inhibidora, por ejemplo, una célula diseñada por cualquier procedimiento descrito en el presente documento. Por ejemplo, la célula puede ser una célula que no expresa o expresa en niveles bajos una molécula inhibidora, por ejemplo, que puede disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR para montar una respuesta efectora inmunitaria. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, Gal9, adenosina, y TGFR beta. La inhibición de una molécula inhibidora, por ejemplo, mediante la inhibición a nivel de ADN, ARN o proteína, puede optimizar el rendimiento de la célula que expresa CAR. En los ejemplos, se puede utilizar un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo, un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo, un ARN de doble cadena, por ejemplo, un siARN o shARN, repeticiones palindrómicas cortas inerespaciadas regularmente agrupadas (CRISPR), nucleasa efectora similar a activador de la transcripción (TALEN), o endonucleasa de dedos de zinc (ZFN).

siARN y shARN para inhibir TCR o HLA

[0478] En algunos casos, la expresión de TCR y/o la expresión de HLA puede ser inhibida usando siARN o shARN que reconocen un ácido nucleico que codifica un TCR y/o HLA, y/o una molécula inhibidora descrita en el presente documento (por ejemplo, PD1, PD-L1 , PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, Gal9, adenosina, y TGFR beta), en una célula T.

[0479] La expresión de siARN y shARN en las células T se puede conseguir utilizando cualquier sistema de expresión convencional, por ejemplo, tal como un sistema de expresión lentiviral.

[0480] Los ejemplos de shARN que regulan por disminución la expresión de los componentes del TCR se describen, por ejemplo, en la Publicación de los Estados Unidos No.: 2012/0321667. Los siARN y shARN de ejemplo que regulan por disminución la expresión de genes de HLA de clase I y/o HLA de clase II se describen, por ejemplo, en la publicación de Estados Unidos No.: 2007/0036773.

CRISPR para inhibir TCR o HLA

[0481] "CRISPR" o "CRISPR para TCR y/o HLA" o "CRISPR para inhibir TCR y/o HLA" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un conjunto de repeticiones palindrómicas cortas inerespaciadas regularmente agrupadas o un sistema que comprende un conjunto de tales repeticiones. "Cas", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína asociada a CRISPR. Un sistema de "CRISPR/Cas" se refiere a un sistema derivado de CRISPR y Cas que se puede utilizar para silenciar o mutar un gen de TCR y/o HLA, y/o una molécula inhibidora descrita en el presente documento (por ejemplo, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276) , B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, Gal9, adenosina, y TGFR beta).

[0482] Los sistemas CRISPR/Cas de origen natural se encuentra en aproximadamente el 40% de los genomas secuenciados de eubacterias y 90% de arqueas secuenciadas. Grissa et al. (2007) BMC Bioinformatics 8: 172. Este sistema es un tipo de sistema inmune procariota que confiere resistencia a elementos genéticos extraños, tales como plásmidos y fagos, y proporciona una forma de inmunidad adquirida. Barrangou et al. (2007) Science 315: 1709-1712; Marragini et al. (2008) Science 322: 1843-1845.

[0483] El sistema de CRISPR/Cas se ha modificado para el uso en la edición de genes (silenciamiento, mejora o cambio de genes específicos) en eucariotas, tales como ratones o primates. Wiedenheft et al. (2012) Nature 482: 331-8. Esto se logra mediante la introducción en la célula eucariota de un plásmido que contiene un CRISPR diseñado específicamente y uno o más Cas apropiados.

[0484] La secuencia de CRISPR, a veces llamado un locus de CRISPR, comprende repeticiones y espaciadores alternos. En un CRISPR de origen natural, los espaciadores comprenden habitualmente secuencias extrañas a la bacteria, tal como un plásmido o secuencia de fago; en TCR y/o el sistema HLA CRISPR/Cas, los espaciadores se derivan de la secuencia del gen de TCR o HLA.

[0485] El ARN del locus de CRISPR se expresa constitutivamente y se procesa por proteínas Cas en pequeños ARN. Estos comprenden un espaciador flanqueado por una secuencia de repetición. Los ARN guían a otras proteínas Cas para silenciar elementos genéticos exógenos a nivel de ARN o ADN. Horvath et al. (2010) Science 327: 167-170; Makarova et al. (2006) Biology direct 1: 7. Los espaciadores de este modo sirven como plantillas para moléculas de ARN, de forma análoga a siARN. Pennisi (2013) Science 341: 833-836.

[**0486]** Como se producen de forma natural en muchos tipos diferentes de bacterias, las disposiciones exactas de CRISPR y la estructura, la función y el número de genes de Cas y su producto difieren algo de especie a especie. Haft et al. (2005) PLoS Comput. Biol. 1: e60; Kunin y et al. (2007) Genome Biol. 8: R61; Mojica et al. (2005) J. Mol. Evol. 60: 174-182; Bolotin et al. (2005) Microbiol. 151: 2551-2561; Pourcel et al. (2005) Microbiol. 151: 653-663; y Stern et al. (2010) Trends. Gineta. 28: 335-340. Por ejemplo, las proteínas Cas (subtipo de Cas, E. coli) (por ejemplo, CasA) forman un complejo funcional, Cascade, que procesa las transcripciones de ARN de CRISPR en espaciador-unidades de repetición que Cascade conserva. Brouns et al. (2008) Science 321: 960-964. En otros procariotas, Cas6 procesa la transcripción de CRISPR. La inactivación del fago a base de CRISPR en E. coli requiere Cascade y Cas3, pero no Cas1 o Cas2. Las proteínas Cmr (módulo Cas RAMP) en Pyrococcus furiosus y otros procariotas forman un complejo funcional con pequeños ARN de CRISPR que reconoce y escinde ARN diana complementarios. Un sistema de CRISPR más simple se basa en la proteína Cas9, que es una nucleasa con dos sitios de corte activos, una para cada cadena de la doble hélice. La combinación de Cas9 y ARN de locus de CRISPR modificado se puede utilizar en un sistema para la edición de genes. Pennisi (2013) Science 341: 833-836.

[0487] El sistema CRISPR/Cas por lo tanto puede ser utilizado para editar un gen de TCR y/o HLA (adición o eliminación de un par de bases), o la introducción de una parada prematura que de este modo disminuye la expresión de un TCR y/o HLA. El sistema CRISPR/Cas alternativamente se puede utilizar como ARN de interferencia, desconexión del gen de TCR y/o HLA de una manera reversible. En una célula de mamífero, por ejemplo, el ARN puede guiar la proteína Cas a un promotor de TCR y/o HLA, que bloquea estéricamente de ARN polimerasas.

[0488] Pueden generarse sistemas artificiales de CRISPR/Cas que inhiben TCR y/o HLA, utilizando la tecnología conocida en la técnica, por ejemplo, la que se describe en la Publicación de Estados Unidos No.20140068797, y Cong (2013) Science 339: 819-823. También se pueden generar otros sistemas artificiales de CRISPR/Cas que inhiben TCR y/o HLA, por ejemplo, los que se describen en Tsai (2014) Nature Biotechnol., 32: 6 569-576, patentes de Estados Unidos Nos.: 8.871.445; 8.865.406; 8.795.965; 8.771.945; y 8.697.359.

TALEN para inhibir TCR y/o HLA

[0489] "TALEN" o "TALEN para HLA y/o TCR" o "TALEN para inhibir HLA y/o TCR" se refiere a una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción, una nucleasa artificial que puede ser utilizado para editar el gen de HLA y/o TCR, y/o una molécula inhibidora descrita en el presente documento (por ejemplo, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC clase II, Gal9 , adenosina, y TGFR beta).

[0490] TALEN se producen artificialmente mediante la fusión de un dominio de unióna ADN efector de TAL a un dominio de escisión de ADN. Los efectos similares a un activador de transcripción (TALE) se pueden diseñar para unirse a cualquier secuencia de ADN deseada, incluyendo una porción del gen de HLA o TCR. Mediante la combinación de un TALE diseñado con un dominio de escisión de ADN, puede producirse una enzima de restricción que es específica para cualquier secuencia de ADN deseada, incluyendo una secuencia de HLA o TCR. Estas pueden ser introducidas en una célula, enl a que se pueden utilizar para la edición del genoma. Boch (2011) Nature Biotech. 29: 135-6; y Boch et al. (2009) Science 326: 1509-1512; Moscou et al. (2009) Science 326: 3501.

[0491] TALE son proteínas secretadas por las bacterias Xanthomonas. El dominio de unión a ADN contiene una secuencia de 33-34 aminoácidos repetida, altamente conservada, con la excepción de los aminoácidos 12 y 13. Estas dos posiciones son muy variables, mostrando una fuerte correlación con el reconocimiento específico de nucleótidos. De este modo, se pueden diseñar para unirse a una secuencia de ADN deseada.

[0492] Para producir un TALEN, una proteína TALE se fusiona con una nucleasa (N), que es una endonucleasa FokI de tipo salvaje o mutada. Se han producido varias mutaciones en FokI para su uso en TALEN; éstas, por ejemplo, mejoran la especificidad o actividad de escisión. Cermak et al. (2011) Nucl. Acids Res. 39: e82; Miller et al. (2011) Nature Biotech. 29: 143-8; Hockemeyer et al. (2011) Nature Biotech. 29: 731-734; Wood et al. (2011) Science 333: 307; Doyon et al. (2010) Nature Methods 8: 74-79; Szczepek et al. (2007) Nature Biotech. 25: 786-793; y Guo et al. (2010) J. Mol. Biol. 200: 96.

[0493] El dominio FokI funciona como un dímero, requiriendo dos construcciones con dominios de unión a ADN únicos para los sitios en el genoma diana con la orientación y la separación adecuadas. Tanto el número de residuos de aminoácidos entre el dominio de unión a ADN de TALE y el dominio de escisión de FokI como el número de bases entre los dos sitios de unión individuales de TALEN parecen ser parámetros importantes para lograr altos niveles de actividad. Miller et al. (2011) Nature Biotech. 29: 143-8.

[0494] Se puede utilizar un TALEN de HLA o TCR dentro de una célula para producir una rotura de doble cadena (DSB). Puede introducirse una mutación en el lugar de rotura si los mecanismos de reparación reparan la rotura de manera inadecuada a través de la unión de extremos no homólogos. Por ejemplo, la reparación inadecuada puede introducir una mutación por desplazamiento de marco. Alternativamente, puede introducirse un ADN extraño en la célula junto con el TALEN; dependiendo de las secuencias de ADN extraño y la secuencia cromosómica, este proceso se puede utilizar para corregir un defecto en el gen de HLA o TCR o introducir tal defecto tal en un gen wt de HLA o TCR, lo que disminuye la expresión de HLA o TCR.

[0495] Se pueden construir TALEN específicos a las secuencias en HLA o TCR usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo varios esquemas que utilizan componentes modulares. Zhang et al. (2011) Nature Biotech. 29: 149-53; Geibler et al. (2011) PLoS ONE 6: e19509.

Nucleasa de Dedos de zinc para inhibir HLA y/o TCR

[0496] "ZFN" o "Nucleasa de dedos de Zinc" o "ZFN para HLA y/o TCR" o "ZFN para inhibir HLA y/o TCR" se refieren a una nucleasa de dedos de zinc, una nucleasa artificial que puede ser utilizado para editar el gen de HLA y/o TCR, y/o una molécula inhibidora descrita en el presente documento (por ejemplo, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5) , LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1,

CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, Gal9, adenosina, y TGFR beta).

[0497] Como un TALEN, un ZFN comprende un dominio de nucleasa FokI (o derivado del mismo) fusionado a un dominio de unión a ADN. En el caso de un ZFN, el dominio de unión a ADN comprende uno o más dedos de zinc. Carroll et al. (2011) Genética Society of America 188: 773-782; y Kim et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 1156-1160.

[0498] Un dedo de zinc es un motivo estructural de proteína pequeña estabilizado por uno o más iones de cinc. Un dedo de zinc puede comprender, por ejemplo, Cys2His2, y puede reconocer una secuencia de aproximadamente 3 pb. Se pueden combinar varios dedos de zinc de especificidad conocida para producir polipéptidos multi-dedo que reconocen secuencias de aproximadamente 6, 9, 12, 15 o 18 pb. Varias técnicas de selección y de montaje modular están disponibles para generar dedos de zinc (y combinaciones de los mismos) que reconocen secuencias específicas, incluyendo expresión en fagos, sistemas de un híbrido de levadura, sistemas bacterianos de un híbrido y dos híbridos, y células de mamífero.

[0499] Como un TALEN, un ZFN debe dimerizarse para escindir el ADN. Por lo tanto, se requiere un par de ZFNs para reconocer sitios de ADN no palindrómicos. Los dos ZFN individuales deben unir cadenas opuestas del ADN con sus nucleasas adecuadamente espaciadas. Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 10570-5.

[0500] También como TALEN, un ZFN puede crear una rotura de la doble cadena en el ADN, que puede crear una mutación de desplazamiento de marco si se repara incorrectamente, lo que lleva a una disminución en la expresión y la cantidad de HLA y/o TCR en una célula. Los ZFN también se pueden utilizar con la recombinación homóloga para mutar en el gen de HLA o TCR.

[0501] Se pueden construir ZFN específicos a las secuencias en HLA y/o TCR usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Provasi (2011) Nature Med. 18: 807-815; Torikai (2013) Blood 122: 1341-1349; Cathomen et al. (2008) Mol. Ther. 16: 1200-7; y Guo et al. (2010) J. Mol. Biol. 400: 96; publicación de Patente de Estados Unidos 2011/0158957; y la publicación de patente de Estados Unidos 2012/0060230.

EXPRESIÓN DE LA TELOMERASA

[0502] Aunque no se desea estar ligado por ninguna teoría en particular, en algunos casos, una célula T terapéutica (por ejemplo, una célula T CD4+ o una célula T CD8+) tiene persistencia a corto plazo en un paciente, debido a telómeros acortados en la célula T; en consecuencia, la transfección con un gen de la telomerasa puede alargar los telómeros de la célula T y mejorar la persistencia de la célula T en el paciente. Ver Carl June, "Adoptive T cell therapy for cáncer in the clinic", Journal of Clinical Investigation, 117: 1466-1476 (2007). Así, en un ejemplo, una célula efectora inmunitaria, por ejemplo, una célula T, expresa ectópicamente una subunidad de la telomerasa, por ejemplo, la subunidad catalítica de la telomerasa, por ejemplo, TERT, por ejemplo, hTERT. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un procedimiento para producir una célula que expresa CAR, que comprende poner en contacto una célula con un ácido nucleico que codifica una subunidad de la telomerasa, por ejemplo, la subunidad catalítica de la telomerasa, por ejemplo, TERT, por ejemplo, hTERT. La célula puede ponerse en contacto con el ácido nucleico antes de, simultáneamente con, o después de ser puesto en contacto con una construcción que codifica un CAR.

[0503] En un aspecto, la descripción presenta un procedimiento de fabricación de una población de células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T o células NK). En un ejemplo, el procedimiento comprende: proporcionar una población de células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T o células NK), poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica un CAR; y poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica una subunidad de la telomerasa, por ejemplo, hTERT, bajo condiciones que permiten la expresión de CAR y telomerasa.

[0504] En un ejemplo, el ácido nucleico que codifica la subunidad de la telomerasa es ADN. En un ejemplo, el ácido nucleico que codifica la subunidad de telomerasa comprende un promotor capaz de impulsar la expresión de la subunidad de la telomerasa.

[0505] En un ejemplo, la hTERT tiene la secuencia de aminoácidos de GenBank Protein ID AAC51724.1 (Meyerson et al., " hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization", Cell Volume 90, Número 4, 22 agosto de 1997, páginas 785 a 795), tal como se indica a continuación:

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVA
QCLVCVPWDARPPPAAPSFRQVSCLKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARG
GPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFVLVAPSCA
YQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRR
GGSASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSPARPAEEA
TSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEQL
RPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNH
AQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPEEEDTDPRRLVQLLRQHSSP
WQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHNERRFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVR
GCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFQKNRL
FFYRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI
VNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRAW
RTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQK
AAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFD
VFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIPQGSILSTLLCSLCYGDMENKLFAGIRRDGLLLRL
VDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVVNFPVEDEALGGTAFVQMP
AHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGVLRLK
CHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLLQAYRFHACVLQLPFHQQVWKNPTFFLRVISDTA
SLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGSLR
TAQTQLSRKLPGTTLTALEAAANPALPSDFKTILD (SEQ ID NO: 108)

[0506] En un ejemplo, la hTERT tiene una secuencia al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96 ^, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 108. En un ejemplo, hTERT tiene una secuencia de SEQ ID nO: 108. En un ejemplo, la hTERT comprende una deleción (por ejemplo, de no más de 5, 10, 15, 20, o 30 aminoácidos) en el extremo N-terminal, el extremo C-terminal, o ambos. En un ejemplo, la HTERT comprende una secuencia de aminoácidos transgénica (por ejemplo, de no más de 5, 10, 15, 20, o 30 aminoácidos) en el extremo N-terminal, el extremo C-terminal, o ambos.

[0507] En un ejemplo, la hTERT es codificada por la secuencia de ácido nucleico de GenBank nº de acceso AF018167 (Meyerson et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization", Cell Volume 90, Número 4, 22 agosto de 1997, páginas 785 a 795):

```
   1 caggcagcgt ggtcctgctg cgcacgtggg aagccctggc cccggccacc cccgcgatgc
  61 cgcgcgctcc ccgctgccga gccgtgcgct ccctgctgcg cagccactac cgcgaggtgc
 121 tgccgctggc cacgttcgtg cggcgcctgg ggccccaggg ctggcggctg gtgcagcgcg
 181 gggacccggc ggctttccgc gcgctggtgg cccagtgcct ggtgtgcgtg ccctgggacg
 241 cacggccgcc ccccgccgcc ccctccttcc gccaggtgtc ctgcctgaag gagctggtgg
 301 cccgagtgct gcagaggctg tgcgagcgcg gcgcgaagaa cgtgctggcc ttcggcttcg
 361 cgctgctgga cggggcccgc gggggccccc ccgaggcctt caccaccagc gtgcgcagct
 421 acctgcccaa cacggtgacc gacgcactgc gggggagcgg ggcgtggggg ctgctgttgc
 481 gccgcgtggg cgacgacgtg ctggttcacc tgctggcacg ctgcgcgctc tttgtgctgg
 541 tggctcccag ctgcgcctac caggtgtgcg ggccgccgct gtaccagctc ggcgctgcca
 601 ctcaggcccg gcccccgcca cacgctagtg gaccccgaag gcgtctggga tgcgaacggg
 661 cctggaacca tagcgtcagg gaggccgggg tccccctggg cctgccagcc ccgggtgcga
 721 ggaggcgcgg gggcagtgcc agccgaagtc tgccgttgcc caagaggccc aggcgtggcg
 781 ctgcccctga gccggagcgg acgcccgttg ggcaggggtc ctgggcccac ccgggcagga
 841 cgcgtggacc gagtgaccgt ggtttctgtg tggtgtcacc tgccagaccc gccgaagaag
 901 ccacctcttt ggagggtgcg ctctctggca cgcgccactc ccacccatcc gtgggccgcc
 961 agcaccacgc gggccccccа tccacatcgc ggccaccacg tccctgggac acgccttgtc
1021 ccccggtgta cgccgagacc aagcacttcc tctactcctc aggcgacaag gagcagctgc
1081 ggccctcctt cctactcagc tctctgaggc ccagcctgac tggcgctcgg aggctcgtgg
1141 agaccatctt tctgggttcc aggccctgga tgccagggac tccccgcagg ttgccccgcc
1201 tgccccagcg ctactggcaa atgcggcccc tgtttctgga gctgcttggg aaccacgcgc
1261 agtgccccta cggggtgctc ctcaagacgc actgcccgct gcgagctgcg gtcaccccag
1321 cagccggtgt ctgtgcccgg gagaagcccc agggctctgt ggcggccccc gaggaggagg
1381 acacagaccc ccgtcgcctg gtgcagctgc tccgccagca cagcagcccc tggcaggtgt
1441 acggcttcgt gcgggcctgc ctgcgccggc tggtgccccc aggcctctgg ggctccaggc
1501 acaacgaacg ccgcttcctc aggaacacca agaagttcat ctccctgggg aagcatgcca
1561 agctctcgct gcaggagctg acgtggaaga tgagcgtgcg gggctgcgct tggctgcgca
1621 ggagcccagg ggttggctgt gttccggccg cagagcaccg tctgcgtgag gagatcctgg
1681 ccaagttcct gcactggctg atgagtgtgt acgtcgtcga gctgctcagg tctttctttt
1741 atgtcacgga gaccacgttt caaaagaaca ggctcttttt ctaccggaag agtgtctgga
```

```
1801 gcaagttgca aagcattgga atcagacagc acttgaagag ggtgcagctg cgggagctgt
1861 cggaagcaga ggtcaggcag catcgggaag ccaggcccgc cctgctgacg tccagactcc
1921 gcttcatccc caagcctgac gggctgcggc cgattgtgaa catggactac gtcgtgggag
1981 ccagaacgtt ccgcagagaa aagagggccg agcgtctcac ctcgagggtg aaggcactgt
2041 tcagcgtgct caactacgag cgggcgcggc gccccggcct cctgggcgcc tctgtgctgg
2101 gcctggacga tatccacagg gcctggcgca ccttcgtgct gcgtgtgcgg gcccaggacc
2161 cgccgcctga gctgtacttt gtcaaggtgg atgtgacggg cgcgtacgac accatccccc
2221 aggacaggct cacggaggtc atcgccagca tcatcaaacc ccagaacacg tactgcgtgc
2281 gtcggtatgc cgtggtccag aaggccgccc atgggcacgt ccgcaaggcc ttcaagagcc
2341 acgtctctac cttgacagac ctccagccgt acatgcgaca gttcgtggct cacctgcagg
2401 agaccagccc gctgagggat gccgtcgtca tcgagcagag ctcctccctg aatgaggcca
2461 gcagtggcct cttcgacgtc ttcctacgct tcatgtgcca ccacgccgtg cgcatcaggg
2521 gcaagtccta cgtccagtgc caggggatcc cgcagggctc catcctctcc acgctgctct
2581 gcagcctgtg ctacggcgac atggagaaca agctgtttgc ggggattcgg cgggacgggc
2641 tgctcctgcg tttggtggat gatttcttgt tggtgacacc tcacctcacc cacgcgaaaa
2701 ccttcctcag gaccctggtc cgaggtgtcc ctgagtatgg ctgcgtggtg aacttgcgga
2761 agacagtggt gaacttccct gtagaagacg aggccctggg tggcacggct tttgttcaga
2821 tgccggccca cggcctattc ccctggtgcg gcctgctgct ggatacccgg accctggagg
2881 tgcagagcga ctactccagc tatgcccgga cctccatcag agccagtctc accttcaacc
2941 gcggcttcaa ggctgggagg aacatgcgtc gcaaactctt tggggtcttg cggctgaagt
3001 gtcacagcct gtttctggat ttgcaggtga acagcctcca gacggtgtgc accaacatct
3061 acaagatcct cctgctgcag gcgtacaggt ttcacgcatg tgtgctgcag ctcccatttc
3121 atcagcaagt ttggaagaac cccacatttt tcctgcgcgt catctctgac acggcctccc
3181 tctgctactc catcctgaaa gccaagaacg cagggatgtc gctgggggcc aagggcgccg
3241 ccggccctct gccctccgag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcattc ctgctcaagc
3301 tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tcctggggtc actcaggaca gcccagacgc
3361 agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgccct ggaggccgca gccaacccgg
3421 cactgccctc agacttcaag accatcctgg actgatggcc acccgcccac agccaggccg
3481 agagcagaca ccagcagccc tgtcacgccg ggctctacgt cccagggagg gaggggcggc
3541 ccacacccag gcccgcaccg ctgggagtct gaggcctgag tgagtgtttg gccgaggcct
3601 gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaagggc
3661 tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttcact tccccacagg ctggcgctcg gctccacccc
3721 agggccagct tttcctcacc aggagcccgg cttccactcc ccacatagga atagtccatc
3781 cccagattcg ccattgttca cccctcgccc tgccctcctt tgccttccac ccccaccatc
3841 caggtggaga ccctgagaag gaccctggga gctctgggaa tttggagtga ccaaaggtgt
3901 gccctgtaca caggcgagga ccctgcacct ggatgggggt ccctgtgggt caaattgggg
3961 ggaggtgctg tgggagtaaa atactgaata tatgagtttt tcagttttga aaaaaaaaaa
4021 aaaaaaa (SEQ ID NO: 109)
```

[0508] En un ejemplo, la hTERT es codificada por un ácido nucleico que tiene una secuencia al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 109. En un ejemplo, la hTERT es codificada por un ácido nucleico de SEQ ID NO: 109.

ACTIVACIÓN Y EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS EFECTORAS INMUNITARIAS, POR EJEMPLO, CÉLULAS T

[0509] Las células efectoras inmunitarias, tales como células T, pueden ser activadas y expandidas generalmente usando los procedimientos descrtos, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 6,352,694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041; y la solicitud de patente de Estados Unidos No. 20060121005.

[0510] El procedimiento para la expansión ex vivo de células madre y progenitoras hematopoyéticas se describe en la patente de los Estados Unidos. No. 5.199.942 y se puede aplicar a las células de la presente descripción. Otros procedimientos adecuados son conocidos en la técnica, por lo tanto, la presente invención no se limita a ningún procedimiento particular de la expansión ex vivo de las células. Brevemente, el cultivo ex vivo y la expansión de células T puede comprender: (1) recoger células madre y progenitoras hematopoyéticas CD34+ de un mamífero de la recogida de sangre peiférica o explantes de médula ósea; y (2) expandir tales células ex vivo. Además de los factores de crecimiento celular descritos en la patente de los Estados Unidos. No. 5.199.942, otros factores tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y el ligando c-kit, se pueden utilizar para el cultivo y la expansión de las células.

[0511] En general, la población de células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células agotadas en células T reguladoras, puede expandirse en contacto con una superficie tiene unida a la misma un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células T. En una célula T, una molécula coestimuladora es una pareja de unión en una célula T que se une a un ligando coestimulador, mediando una respuesta coestimuladora en la célula T, es decir, una molécula de MHC de clase I, por ejemplo, CD28. Para la estimulación de una molécula accesoria (por ejemplo, CD3) en la superficie de las células T, se usa un ligando que se une a la molécula accesoria. Una población de células T se puede expandir con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28 en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de las células T. Para estimular la proliferación de célula T CD4+ o célula T CD8+, se utilizaría un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Los ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besançon, Francia; (Berg et al, Transplant Proc 30 (8): 3975-3977, 1998; Haanen et al, J Exp. Med. 190 (9): 13191328, 1999; Garland et al, J. Immunol Meth 227 (1-2): 53-63, 1999).

[0512] En ciertos casos, la señal de activación primaria y la señal coestimuladora para la célula T pueden ser proporcionadas por diferentes protocolos. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando se acopla a una superficie, los agentes pueden estar acoplados a la misma superficie (es decir, en formación "cis") o a superficies separadas (es decir, en formación "trans"). Alternativamente, un agente puede acoplarse a una superficie y el otro agente en solución. En un caso, el agente que proporciona la señal coestimuladora se une a la superficie de una célula y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En ciertos casos, ambos agentes pueden estar en solución. En un ejemplo, los agentes pueden estar en forma soluble, y luego reticularse a una superficie, tal como una célula que expresa receptores de Fc o un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a los agentes. A este respecto, véase, por ejemplo, las solicitudes de patente de Estados Unidos. Nos. 20040101519 y 20060034810 para las células presentadoras de antígeno artificiales (AAPCS) que se contemplan para su uso en la activación y expansión de células T.

[0513] En un ejemplo, los dos agentes se inmovilizan sobre perlas, ya sea en la misma perla, es decir, "cis", o en perlas separadas, es decir, "trans". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que proporciona la señal coestimuladora es un anticuerpo anti-CD28 o fragmento de unión a antígeno del mismo; y ambos agentes están co-inmovilizados en la misma perla en cantidades moleculares equivalentes. En un ejemplo, se utiliza una proporción 1:1 de cada anticuerpo unido a las perlas para la expansión de células T CD4+ y/o células T CD8+y el crecimiento de las células T. En ciertos casos, se utiliza una relación de anticuerpos anti CD3: CD28 unidos a las perlas, de tal manera que se observa un aumento en la expansión de células T en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. En un ejemplo, un aumento de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 veces se observa en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. En un ejemplo, la relación de anticuerpo CD3:CD28 unido a las perlas varía de 100:1 a 1:100 y todos los valores enteros entre ellos. En un ejemplo, más anticuerpo anti-CD28 se une a las partículas que anticuerpo anti-CD3, es decir, la relación de CD3:CD28 es menor que uno. En ciertos casos, la relación de anticuerpo anti CD28 con respecto a anticuerpo anti CD3 unidos a las perlas es mayor que 2:1. En un ejemplo, se utiliza relación CD3:CD28 1:100 de anticuerpo unido a las perlas. En un ejemplo, se utiliza relación CD3:CD28 1:75 de anticuerpo unido a las perlas. En un ejemplo adicional, se utiliza relación CD3:CD28 1:50 de anticuerpo unido a las perlas. En un ejemplo, se utiliza relación CD3:CD28 1:30 de anticuerpo unido a las perlas. En un ejemplo, se utiliza relación CD3:CD28 1:10 de anticuerpo unido a las perlas. En otro ejemplo, se utiliza relación CD3:CD28 1:3 de anticuerpo unido a las perlas. En aún otro ejemplo, se utiliza relación CD3:CD28 3:1 de anticuerpo unido a las perlas.

[0514] Las proporciones de partículas con respecto a células de 1:500 a 500:1 y cualesquiera de valores enteros en el medio pueden ser usadas para estimular las células T u otras células diana. Como los expertos ordinarios en la técnica pueden apreciar fácilmente, la proporción de partículas a las células puede depender del tamaño de partícula

con respecto a la célula diana. Por ejemplo, perlas de tamaño pequeño sólo podrían unirse a unas pocas células, mientras que granos más grandes podrían unirse a muchas. En ciertos casos, la proporción de células a las partículas varía de 1:100 a 100:1, y con valores enteros en el medio y en otros casos la relación comprende de 1:9 a 9:1 y cualesquiera de los valores enteros en el medio, también se pueden utilizar para estimular células T. La relación de partículas acopladas a anti-CD3 y anti-CD28 con respecto a las células T que dan como resultado la estimulación de células T puede variar como se señaló anteriormente, sin embargo ciertos valores preferidos incluyen 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, y 15:1 con una relación preferida de al menos 1:1 partículas por célula T. En un ejemplo, se utiliza una relación de partículas a células de 1:1 o menos. En un ejemplo particular, una proporción preferida de partículas a células es de 1:5. En otros casos, la relación de partículas a células puede variar dependiendo del día de la estimulación. Por ejemplo, en un ejemplo, la relación de partículas a células es de 1:1 a 10:1 en el primer día y las partículas adicionales se añaden a las células cada día o cada dos días a partir de entonces durante hasta 10 días, a las relaciones finales de 1:1 a 1:10 (basado en los recuentos de células en el día de la adición). En un ejemplo particular, la relación de partículas a células es de 1:1 en el primer día de la estimulación y se ajustó a 1:5 en el tercer y quinto días de estimulación. En un ejemplo, se añaden partículas cada día o cada dos días en base a una relación final de 1:1 en el primer día, y 1:5 en el tercer y quinto días de estimulación. En un ejemplo, la relación de partículas a células es de 2:1 en el primer día de la estimulación y se ajustó a 1:10 en el tercer y quinto días de estimulación. En un ejemplo, se añaden partículas cada día o cada dos días en base a una relación final de 1:1 en el primer día, y 1:10 en el tercer y quinto días de estimulación. Un experto en la técnica apreciará que una variedad de otras relaciones puede ser adecuada para su uso. En particular, las proporciones pueden variar dependiendo del tamaño de las partículas y del tamaño de la célula y el tipo. En un ejemplo, las proporciones más típicas de uso están en la proximidad de 1:1, 2:1 y 3:1 en el primer día.

[0515] En otros casos, las células, por ejemplo, las células T, se combinan con las perlas recubiertas de agente, las perlas y las células se separan posteriormente, y después se cultivan las células. En un ejemplo alternativo, antes del cultivo, las perlas recubiertas de agente y las células no se separan, pero se cultivan juntos. En un ejemplo adicional, las perlas y las células se concentran en primer lugar mediante la aplicación de una fuerza, tal como una fuerza magnética, que da lugar a un aumento de ligación de marcadores de superficie celular, induciendo de este modo la estimulación de células.

[0516] A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular se pueden ligar al permitir que perlas paramagnéticas a las que están unidos anti-CD3 y anti-CD28 (perlas 3x28) entren en contacto con las células T. En un caso, las células (por ejemplo, 10^4 a 10^9 células T) y las perlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas T CD3/CD28 DYNABEADS® M-450 en una proporción de 1:1) se combinan en un tampón, por ejemplo PBS (sin cationes divalentes tales como, calcio y magnesio). De nuevo, los expertos en la técnica pueden entender fácilmente que se puede utilizar cualquier concentración de células. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy rara en la muestra y comprender solamente un 0,01% de la muestra o toda la muestra (es decir, 100%) puede comprender la célula diana de interés. En ciertos casos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que las partículas y las células están mezcladas (es decir, aumento de la concentración de células), para asegurar el contacto máximo de las células y partículas. Por ejemplo, en un caso, se utiliza una concentración de aproximadamente 10 mil millones de células/ml, 9 mil millones/ml, 8 mil millones/ml, 7 mil millones/ml, 6 mil millones/ml, 5 mil millones/ml, o 2 mil millones de células/ml. En un ejemplo, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En un caso adicional,/ml se usa una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 millones de células. En aún un caso, se usa una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95, o 100 millones de células/ml. En otros casos, se pueden usar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de concentraciones altas puede provocar un aumento del rendimiento celular, activación celular y la expansión de células. Además, el uso de concentraciones celulares elevadas permite la captura más eficaz de células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, tales como células T negativas en CD28. Tales poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable de obtener en ciertos casos. Por ejemplo, la utilización de una alta concentración de células permite una selección más eficaz de células T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

[**0517]** En un caso, las células (por ejemplo, las células T, tales como las células T CD4+ o células T CD8+) transducidas con un ácido nucleico que codifica un CAR, por ejemplo, un CAR descrito en el presente documento, se expanden, por ejemplo, mediante un procedimiento descrito en el presente documento. En un caso, las células se expanden en un cultivo durante un periodo de varias horas (por ejemplo, aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21 horas) a aproximadamente 14 días (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días). En un caso, las células se expanden durante un período de 4 a 9 días. En un caso, las células se expanden durante un período de 8 días o menos, por ejemplo, 7, 6 o 5 días. En un caso, las células, por ejemplo, una célula CAR CD19 descrita en el presente documento, se expande en cultivo durante 5 días, y las células resultantes son más potentes que las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. La potencia se puede definir, por ejemplo, por varias funciones de las células T, por ejemplo, la proliferación, la muerte de células diana, la producción de citocinas, la activación, migración, o combinaciones de los mismos. En un caso, las células, por ejemplo, una célula CAR CD19 descrita en el presente documento, expandida durante 5 días muestra un incremento de al menos una, dos, tres o cuatro veces en duplicaciones celulares tras la estimulación de antígeno en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días bajo las mismas condiciones de

cultivo. En un caso, las células, por ejemplo, las células que expresan un CAR CD19 descrita en el presente documento, se expanden en cultivo durante 5 días, y las células resultantes exhiben una mayor producción de citocinas proinflamatorias, por ejemplo, niveles de IFN-γ y/o GM-CSF, en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. En un ejemplo, las células, por ejemplo, una célula CAR CD19 descrita en el presente documento, expandida durante 5 días muestran un aumento de al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, diez veces o más en pg/ml de producción de citocinas proinflamatorias, por ejemplo, los niveles de IFN-γ y/o GM-CSF, en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo.

[0518] En un ejemplo, la mezcla (de células T y de agente de estimulación) puede cultivarse durante varias horas (alrededor de 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor entero de hora en el medio. En un ejemplo, la mezcla puede ser cultivada durante 21 días. En un ejemplo, las perlas y las células T se cultivan juntos durante aproximadamente ocho días. En un ejemplo, las perlas y las células T se cultivan juntos durante 2-3 días.

[0519] También pueden ser deseables varios ciclos de estimulación de tal manera que el tiempo de cultivo de las células T puede ser de 60 días o másolt. Las condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o, X-vivo 15, (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad, incluyendo suero (por ejemplo, suero bovino o humana fetal), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-γ, IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGFβ, y TNF-α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocidas por el experto en la materia. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero no se limitan a, agente tensioactivo, plasmanato y agentes reductores, tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α-MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con adición de aminoácidos, piruvato de sodio, y vitaminas, ya sean libres de suero o complementados con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y expansión de células T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomicina, se incluyen sólo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que han de infusionarse en un sujeto. Las células diana se mantienen en condiciones necesarias para soportar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura (por ejemplo, 37 °C) y atmósfera apropiadas (por ejemplo, aire más 5% de CO_2).

[0520] En un ejemplo, las células (por ejemplo, las células T, tales como las células T CD4+ o células T CD8 +) se expanden en un medio apropiado (por ejemplo, medios descritos en el presente documento) que incluye una o más interleucina que da lugar a al menos un aumento de 200 veces (por ejemplo, 200 veces, 250 veces, 300 veces, 350 veces) de las células durante un período de expansión 14 días, por ejemplo, medido mediante un procedimiento descrito en el presente documento, tal como la citometría de flujo. En un ejemplo, las células se expanden en presencia de IL-15 y/o IL-7 (por ejemplo, IL-15 e IL-7).

[0521] En casos, los procedimientos descritos en el presente documento, por ejemplo, procedimientos de fabricación de células que expresan CAR, comprenden extraer células T reguladoras, por ejemplo, células T CD25+, de una población de células, (por ejemplo, células T, tales como células T CD4+ o células T CD8+), por ejemplo, utilizando un anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, o un ligando de unión a CD25, IL-2. Los procedimientos de extracción de células T reguladoras, por ejemplo, células T CD25+, de una población de células se describen en el presente documento. En casos, los procedimientos, por ejemplo, procedimientos de fabricación que comprenden además poner en contacto una población de células (por ejemplo, una población de células en la que las células T reguladoras, tales como células T CD25+, se han agotado, o una población de células que ha contactado previamente con un anticuerpo anti-CD25, fragmento del mismo, o ligando de unión a CD25) con IL-15 y/o IL-7. Por ejemplo, la población de células (por ejemplo, que se ha contactado previamente con un anticuerpo anti-CD25, fragmento del mismo, o ligando de unión a CD25) se expande en presencia de IL-15 y/o IL-7.

[0522] En algunos casos, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento (por ejemplo, una célula T, tal como una célula T CD4+ o una célula T CD8+) se pone en contacto con una composición que comprende un polipéptido de interleucina-15 (IL-15), un polipéptido de receptor alfa de interleucina-15 (IL-15Ra) o una combinación de ambos un polipéptido de IL-15 y un polipéptido de IL-15Ra, por ejemplo, HetIL-15, durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, ex vivo. En casos, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende un polipéptido de IL-15 durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, ex vivo. En casos, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende una combinación de ambos un polipéptido de IL-15 y un polipéptido de IL-15 Ra durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, ex vivo. En casos, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende HetIL-15 durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, ex vivo.

[**0523]** En un caso, la célula que expresa CAR (por ejemplo, una célula T, tal como una célula T CD4+ o una célula T CD8+) descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende HetIL-15 durante la expansión ex vivo. En un caso, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende un polipéptido de IL-15 durante la expansión ex vivo. En un caso, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende tanto un polipéptido de IL-15 como un polipéptido de IL-15Ra durante la expansión ex vivo. En un caso,

la puesta en contacto da lugar a la supervivencia y la proliferación de una subpoblación de linfocitos, por ejemplo, células T CD8 +.

[0524] En un ejemplo, el procedimiento de fabricación descrito en el presente documento comprende además poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias (por ejemplo, las células T, tales como las células T CD4+ o células T CD8 +) con un ácido nucleico que codifica una subunidad de la telomerasa, por ejemplo, hTERT. El ácido nucleico que codifica la subunidad de la telomerasa puede ser ADN.

[0525] Se pueden usar varios ensayos para evaluar la actividad de la molécula CAR, tal como, pero no limitado a, la capacidad de expandir las células T después de la estimulación del antígeno, mantener la expansión de células T en ausencia de reestimulación, y actividades anti-cáncer en modelos de animales apropiados. Los ensayos para evaluar los efectos del CAR, por ejemplo, un CAR EGFRvIII, se describen con más detalle a continuación.

[0526] El análisis de transferencia Western de la expresión CAR en las células T primarias se puede utilizar para detectar su presencia utilizando procedimientos publicados para los CARs. Véase, por ejemplo, Milone et al, Molecular Therapy 17 (8): 1453-1464 (2009). Muy brevemente, las células T (mezcla 1:1 de células T CD4+ y CD8+) que expresa los RCAR se expanden in vitro durante más de 10 días, seguido de la lisis y SDS-PAGE en condiciones reductoras. Los CARs que contienen el dominio citoplasmático TCR-ζ de longitud completa y la cadena TCR-ζ endógena son detectados por transferencia Western utilizando un anticuerpo para la cadena TCR-ζ. Los mismos subconjuntos de células T se utilizan para el análisis SDS-PAGE en condiciones no reductoras para permitir la evaluación de la formación de dímeros covalentes.

[0527] La expansión in vitro de células T CAR+ (es decir, células CART) después de la estimulación del antígeno se puede medir mediante citometría de flujo. Por ejemplo, las células T CD4+ y CD8+, o una mezcla de las mismas, son estimuladas con aAPC o perlas αCD3/αCD28 seguido de la transducción con vectores lentivirales que expresan GFP bajo el control de los promotores a analizar. Los promotores de ejemplo incluyen los promtores del gen de CMV IE, EF-1α, ubiquitina C o fosfogliceroquinasa (PGK). La fluorescencia de GFP se evalúa en el día 6 de cultivo en los subconjuntos de células T CD4+ y/o CD8+ mediante citometría de flujo. Véase, por ejemplo, Milone et al, Molecular Therapy 17 (8): 1453-1464 (2009). Alternativamente, las células T CD4+ y CD8+, o una mezcla de las mismos, se estimulan con perlas magnéticas recubiertas con αCD3/αCD28 en el día 0, y se transducen con CAR en el día 1 utilizando un vector lentiviral bicistrónico que expresa CAR junto con eGFP usando una secuencia “ribosomal skipping” 2A. Los cultivos se volvieron a estimular con construcciones de CAR en presencia de anticuerpo antiCD3 y anti CD28 (K562-BBL-3/28) después del lavado. Se añade IL-2 exógena a los cultivos cada dos días a 100 UI/ml. Las células T GFP+ se enumeran mediante citometría de flujo utilizando el recuento basado en perlas. . Véase, por ejemplo, Milone et al, Molecular Therapy 17 (8): 1453-1464 (2009).

[0528] La expansión sostenida de células T CAR+ en ausencia de re-estimulación también se puede medir. Véase, por ejemplo, Milone et al, Molecular Therapy 17 (8): 1453-1464 (2009). Brevemente, se mide el volumen medio de células T (fl) en el día 8 de cultivo usando un contador de partículas Coulter Multisizer III, un Nexcelom Cellometer Vision o Millipore Scepter, después de la estimulación con perlas magnéticas recubiertas con CD3/αCD28 en el día 0, y transducción con el Car indicado en el día 1.

[0529] La evaluación de la proliferación celular y la producción de citocinas ha sido descrita previamente, por ejemplo, en Milone et al, Molecular Therapy 17 (8): 1453-1464 (2009). Brevemente, la evaluación de la proliferación mediada por CAR se lleva a cabo en placas de microtitulación mediante la mezcla de las células T lavadas con células diana, tales como células U87MG, BHK o CHO que expresan EGFRvIII o EGFR de tipo salvaje (wt) o CD32 y CD137 (KT32-BBL) para una relación final de células T:célula diana 1:1. Se añaden anticuerpos monoclonales anti-CD3 (clon OKT3) y anti-CD28 (clon 9.3) a cultivos con células KT32-BBL para servir como un control positivo para la estimulación de la proliferación de células T, ya que estas señales apoyan una expansión de células T CD8+ a largo plazo ex vivo. Las células T se enumeran en cultivos usando perlas fluorescentes CountBright™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y citometría de flujo, tal como se describe por el fabricante. Las células T RCAR+ se identifican mediante la expresión de GFP usando células T que se han diseñado con vectores lentivirales que expresan CAR unidos a eGFP-2A. Para las células T CAR+ que no expresan GFP, las células T RCAR+ se detectan con proteína recombinante biotinilada, por ejemplo, EGFRvIII y un conjugado de avidina-PE secundario. La expresión de CD4+ y CD8+ en las células T también se detectan simultáneamente con anticuerpos monoclonales específicos (BD Biosciences). Las mediciones de citocinas se realizan en sobrenadantes recogidos 24 horas después de la re-estimulación usando el kit con una matriz de perlas citométricas para citosinas TH1/TH2 humanas (BD Biosciences, San Diego, CA) según las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se evalúa usando un citómetro de flujo FACScalibur, y los datos se analizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0530] La citotoxicidad puede evaluarse mediante un ensayo de liberación de ^{51}Cr estándar. Véase, por ejemplo, Milone et al, Molecular Therapy 17 (8): 1453-1464 (2009). Brevemente, las células diana (por ejemplo, células U87MG, BHK o CHO que expresan CAR, por ejemplo, EGFRvIII o EGFR de tipo salvaje (wt)) se cargan con ^{51}Cr (como $NaCrO_4$, New England Nuclear, Boston, MA) a 37 °C durante 2 horas con agitación frecuente, se lavan dos veces en RPMI completo y se siembran en placas de microtitulación. Las células T efectoras se mezclan con células diana en los pocillos en RPMI completo a relaciones variables de células efectoras:células diana (E:T). Los pocillos

adicionales que contienen sólo medios (liberación espontánea, SR) o una solución al 1% de detergente Triton-X 100 (liberación total, TR). Después de 4 horas de incubación a 37 °C, se recoge el sobrenadante de cada pocillo. El ^{51}Cr liberado se mide a continuación utilizando un contador de partículas gamma (Packard Instrument Co., Waltham, MA). Cada condición se lleva a cabo al menos por triplicado, y el porcentaje de lisis se calcula usando la fórmula: % de lisis = (ER-SR)/(TR-SR), donde ER representa el promedio de ^{51}Cr liberado para cada condición experimental. Pueden también utilizarse ensayos de citotoxicidad alternativos, tales como los ensayos de citotoxicidad basados en el flujo. Otros ensayos, incluyendo los descritos en la sección de Ejemplos en el presente documento, así como los que se conocen en la técnica también se pueden utilizar para evaluar las construcciones CAR.

[0531] Alternativamente, o en combinación con los procedimientos descritos en el presente documento, se dan a conocer procedimientos y composiciones para una o más de detección y/o cuantificación de células que expresan CAR (por ejemplo, in vitro o in vivo (por ejemplo, la monitorización clínica)), expansión y/o la activación de células inmunitarias, y/o selección específica de CAR, que implican el uso de un ligando de CAR, En un caso de ejemplo, el ligando de CAR es un anticuerpo que se une a la molécula de CAR, por ejemplo, se une al dominio de unión a antígeno extracelular de CAR (por ejemplo, un anticuerpo que se une al dominio de unióna a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-idiotípico; o un anticuerpo que se une a una región constante del dominio de unión extracelular). En otros casos, el ligando de CAR es una molécula de antígeno CAR (por ejemplo, una molécula de antígeno CAR, tal como se describe en el presente documento).

[0532] En un aspecto, se da a conocer un procedimiento para detectar y/o cuantificar células que expresan CAR. Por ejemplo, el ligando de CAR puede ser utilizado para detectar y/o cuantificar células que expresan CAR in vitro o in vivo (por ejemplo, la monitorización clínica de las células que expresan CAR en un paciente, o la dosificación de un paciente). El procedimiento incluye:
proporcionar el ligando de CAR (opcionalmente, un ligando de CAR marcado, por ejemplo, un ligando de CAR que incluye una etiqueta, una perla, un marcador radioactivo o fluorescente);
adquirir la célula que expresa CAR (por ejemplo, la adquisición de una muestra que contiene células que expresan CAR, tal como una muestra de fabricación o una muestra clínica);
poner en contacto la célula que expresa CAR con el ligando de CAR en condiciones en que se produce la unión, detectando de ese modo el nivel (por ejemplo, cantidad) de las células que expresan CAR presentes. La unión de la célula que expresa CAR con el ligando de CAR se puede detectar usando técnicas estándar, tales como FACS, ELISA y similares.

[0533] En otro aspecto, se da a conocer un procedimiento de expansión y/o activación de células (por ejemplo, células efectoras inmunitarias). El procedimiento incluye:
proporcionar una célula que expresa CAR (por ejemplo, una primera célula que expresa CAR o una célula que expresa CAR transitoriamente);
poner en contacto dicha célula que expresa CAR con un ligando de CAR, por ejemplo, un ligando de CAR tal como se decribe en el presente documento), en condiciones en las que se produce la expansión y/o proliferación de células inmunitarias, produciendo de este modo la población de células activadas y/o expandidas.

[0534] En ciertos casos, el ligando de CAR está presente en (por ejemplo, está inmovilizado o unido a un sustrato, por ejemplo, un sustrato de origen no natural). En algunos casos, el sustrato es un sustrato no celular. El sustrato no celular puede ser un soporte sólido elegido entre, por ejemplo, una placa (por ejemplo, una placa de microtitulación), una membrana (por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa), una matriz, un chip o una perla. En los casos, el ligando de CAR está presente en el sustrato (por ejemplo, sobre la superficie del sustrato). El ligando de CAR se puede inmovilizar, unir o asociar de forma covalente o no covalente (por ejemplo, reticulado) al sustrato. En un caso, el ligando de CAR se une (por ejemplo, se une covalentemente) a una perla. En los casos antes mencionados, la población de células inmunitarias se puede expandir in vitro o ex vivo. El procedimiento puede incluir además el cultivo de la población de células inmunitarias en presencia del ligando de la molécula CAR, por ejemplo, usando cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

[0535] En otros casos, el procedimiento de expansión y/o activación de las células compre además la adición de una segunda molécula estimuladora, por ejemplo, CD28. Por ejemplo, el ligando de CAR y la segunda molécula estimuladora se pueden inmovilizar a un sustrato, por ejemplo, una o más perlas, proporcionando de este modo una mayor expansión y/o activación de las células.

[0536] En otros casos, se proporciona un procedimiento para seleccionar o enriquecer una célula que expresa CAR. El procedimiento incluye poner en contacto la célula que expresa CAR con un ligando de CAR, tal como se describe en el presente documento; y seleccionar la célula sobre la base de la unión del ligando de CAR.

[0537] En aún otros casos, se proporciona un procedimiento de agotamiento (por ejemplo, reducción y/o eliminación) de una célula que expresa CAR. El procedimiento incluye poner en contacto la célula que expresa CAR con un ligando de CAR, tal como se describe en el presente documento; y reconocer la célula sobre la base de la unión del ligando de CAR, reduciendo así el número, y/o eliminando, la célula que expresa CAR. En un ejemplo, el ligando de CAR está acoplado a un agente tóxico (por ejemplo, una toxina o un medicamento de ablación celular). En otro ejemplo, el anticuerpo anti-idiotípico puede causar actividad de células efectoras, por ejemplo,

actividades ADCC o ADC.

[0538] Los anticuerpos anti-CAR de ejemplo que se pueden usar en los procedimientos dados a conocer en el presente documento se describen, por ejemplo, en el documento WO 2014/190273 y por Jena et al., "Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T cells in Clinical Trials", PLOS marzo de 2013 8: 3 e57838. En un caso, la molécula de anticuerpo anti-idiotípico reconoce una molécula de anticuerpo anti-CD 19, por ejemplo, un scFv anti-CD 19. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo anti-idiotípico puede competir por la unión con el clon de mAb de CAR específico de CD19 no. 136.20.1 descrito en Jena et al, PLOS de marzo de 2013 8: 3 e57838; puede tener las mismas CDR (por ejemplo, una o más de, por ejemplo, todas de CDR1 de VH CDR1, CDR2 de VH, CDR3 de CH, CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL, usando la definición de Kabat, la definición de Chothia, o una combinación de las definiciones de Kabat y Chothia), que el clon de mAb de CAR específico de CD19 no. 136.20.1; puede tener una o más (por ejemplo, 2) regiones variables que el clon de mAb de CAR específico de CD19 no. 136.20.1; o puede comprender el clon de mAb de CAR específico de CD19 no. 136.20.1. En algunos casos, el anticuerpo anti-idiotipo se realizó de acuerdo con un procedimiento descrito en Jena et al. En otro caso, la molécula de anticuerpo anti-idiotípico es una molécula de anticuerpo anti-idiotípico descrito en el documento WO 2014/190273. En algunos casos, la molécula de anticuerpo anti-idiotípico tiene las mismas CDR (por ejemplo, una o más de, por ejemplo, todas de CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de CH, CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL) que una molécula de anticuerpo del documento WO 2014/190273, tal como 136.20.1; puede tener una o más (por ejemplo, 2) regiones variables de una molécula de anticuerpo del documento WO 2014/190273, o puede comprender una molécula de anticuerpo del documento WO 2014/190273, tal como 136.20.1. En otros casos, el anticuerpo anti-CAR se une a una región constante del dominio de unión extracelular de la molécula CAR, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 2014/190273. En algunos casos, el anticuerpo anti-CAR se une a una región constante del dominio de unión extracelular de la molécula CAR, por ejemplo, una región constante de cadena pesada (por ejemplo, una región bisagra CH2-CH3) o la región constante de cadena ligera. Por ejemplo, en algunos casos el anticuerpo anti-CAR compite por la unión con el anticuerpo monoclonal 2D3 descrito en el documento WO 2014/190273, tiene las mismas CDR (por ejemplo, una o más de, por ejemplo, todas de CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de CH, CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL) que 2D3, o tiene una o más (por ejemplo, 2) regiones variables de 2D3, o comprende 2D3, tal como se describe en el documento WO 2014/190273.

ACTIVACIÓN Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS TH17

[0539] En una realización, puede ser deseable para obtener una célula 17 T auxiliar (Th17), o una población de células Th17. Las células Th17 son un subgrupo de células T auxiliares. Las células Thl7 (auxiliar T inflamatorias o Th inflamatorias) promueven respuestas de inflamación a través de la secreción de citocinas proinflamatorias, tales como IL-1, IL-6, TNF-a, IL-17, IL21, IL23, y/o a través de la activación y/o la inhibición de otras células T, incluyendo otras células Th (por ejemplo células Thl suprime Th2 y Thl7, Th2 suprime Thl y Thl7).

[0540] Las células Thl 7 o, en cualquier caso, células que muestran el fenotipo de células Thl 7 pueden tener una variedad de propiedades fenotípicas específicas, dependiendo de las condiciones empleadas. Tales propiedades fenotípicas incluyen la producción de IL-17A y de IFNγ. Además, las células Th17 expandidas continúan produciendo IL-17A e IFNγ incluso después de su expansión primaria. En algunos casos, las células Thl 7 coexpresaban RORγt y T-bet, factores de transcripción que regulan Thl7 y el desarrollo de células Thl, respectivamente. En algunas realizaciones, las células Th17 expandidas expresan IL-23R y/o CD 161 en su superficie celular, marcadores fenotípicos asociados con células Thl7 del cordón umbilical. En algunos casos, las células Thl7 expresan RORγt.

[0541] Los procedimientos para obtener una célula Th17 o población de células Th17 incluyen polarización o diferenciación de una célula T CD4+, o una población de células T CD4+. Las células T CD4+, por ejemplo, una población aislada usando los procedimientos descritos anteriormente, se estimulan con agentes que activan CD3 y ICOS, por ejemplo, anticuerpos contra CD3 y ICOS, y a continuación se cultivan en presencia de citocinas y moléculas que permiten la diferenciación a Th17 y la función de Th17, tal como se describe en más detalle a continuación.

[0542] Para estimular la proliferación de las células Thl7, las células puede entrar en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-ICOS, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de las células Th17. Las células Thl7 también pueden estimularse con células presentadoras de antígeno artificial (aAPC) que expresan el ligando ICOS (ICOSL). La estimulación puede realizarse en presencia de citocinas que polarizan Thl7. Un ejemplo de citocinas polarizantes de Thl7 incluye, pero no se limita a, citocinas IL-6, IL-lß e IL-23 y anticuerpos neutralizantes IFNy e IL-4.

[0543] Una célula T CD4+ pueden estimularse para producir una célula Th17 poniendo en contacto un agente con un resto de superficie celular en la célula T. En un aspecto de la presente descripción, los anticuerpos para CD3 e ICOS se cargan en una aAPC. Además, la estimulación puede incluir cualquier ligando que se una al complejo TCR/CD3 e inicia una señal de estimulación primaria. Este ligando puede utilizarse como un agente de activación primaria cargada en o expresada por la aAPC. Cualquier ligando que se une ICOS e inicia la ruta de transducción de señal de ICOS, causando así la coestimulación de la célula con un ligando CD3 y mejorando la activación de una

población de células T, es un ligando de ICOS y, en consecuencia, es un agente coestimulador.

[0544] Las células T pueden exponerse a una perla que comprende un primer agente que se une al complejo TCR/CD3 e inicia una señal de estimulación primaria y un segundo agente que se une ICOS e inicia la vía de transducción de señales ICOS, causando así la coestimulación de la célula con un ligando C3 y la mejora de la activación de una población de células T.

[0545] Las células estimuladas se activan como se muestra mediante la inducción de la transducción de señales, la expresión de marcadores de la superficie celular y/o la proliferación. Los marcadores apropiados para las células Thl7 incluyen, pero no se limitan a, su capacidad para secretar niveles elevados de IL-17A, IL-17F y CCL20. Además, las células generadas y expandidas de acuerdo con el procedimiento de coestimulación de ICOS no sólo exhiben una elevada producción de citocinas asociadas a Thl7, sino también exhiben una elevada secreción de IFNγ, TNFa e IL-21 en comparación con células coestimulabdas con CD28.

[0546] En el contexto de generación de células Thl7 por medio de la estimulación de ICOS en células T, se puede diseñar un aAPC para comprender un primer agente que se une al complejo TCR/CD3 de la célula T y un segundo agente que se une a ICOS, la aAPC además pueden diseñarse para comprender una citocina que promueve la diferenciación de Thl7. Las citocinas diferenciadores de Thl7 de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, IL-2, IL-6, IL-23, e IL-1.

[0547] Por consiguiente, la estimulación de células T puede incluir una aAPC que ha sido modificada genéticamente para expresar agentes estimuladores, agentes co-estimuladores y/o citocinas, así como otros polipéptidos. La aAPC puede manipularse para expresar y secretar cualquier citocina deseable que promueva la diferenciación de Thl7 usando los procedimientos descritos en el presente documento o procedimientos conocidos en la técnica para modificar genéticamente una célula. La citocina puede ser una de longitud completa, fragmento, homólogo, variante o mutante de la citocina. Una citocina incluye una proteína que es capaz de afectar la función biológica de otra cálula. Una función biológica afectada por una citocina puede incluir, pero no se limita a, el crecimiento celular, la diferenciación celular o la muerte celular. En la estimulación de las células Thl7, la citocina puede unirse a un receptor específico en la superficie de la célula, promoviendo así la diferenciación de Thl7. Una citocina preferida incluye, entre otros, un factor de crecimiento hematopoyético, una interleucina, un interferón, una molécula de superfamilia de inmunoglobulina, una molécula de la familia de factor de necrosis tumoral y/o una quimioquina. Una citocina incluye, pero no se limita a, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral alfa (TNFa), factor de necrosis tumoral beta (TNFP), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina-12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15), interleucina-21 (IL-21), interleucina-23 (IL-23), interferón alfa (IFNa), interferón beta (ΓPNβ), interferón gamma (IFN) e IGIF, entre muchas otras. Una citocina más preferida incluye una citocina que promueve la diferenciación de Thl7, incluyendo, pero no limitado a, IL-2, IL-6, IL-1 (por ejemplo, IL-Iβ). Un experto en la técnica entendería, una vez provisto de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que la descripción abarca cualquier citocina promotora de la diferenciación de Thl7, tal como las conocidos en la técnica, así como cualquiera que se descrubra en el futuro.

[0548] Además del diseño de una aAPC que comprenda una citocina promotora de la diferenciación Thl7, la aAPC se puede diseñar para comprender una molécula inhibidora que puede bloquear una citocina que interfiere con el proceso de diferenciación Thl7. Por ejemplo, la aAPC puede diseñarse para secretar un anticuerpo neutralizante que puede inhibir una citocina que interfiere con la diferenciación de Thl7. Una citocina que interfiere con el proceso de diferenciación de Thl7 incluye, pero no se limitan a, IFNγ e IL-4.

[0549] Cuando la AAPC ha sido diseñada para expresar una citocina deseado que promueve la diferenciación de Thl7 y/o un inhibidor de una citocina que interfiere con la diferenciación de Thl7, se proporciona un procedimiento para activar y/o estimular una población de células T para promover la diferenciación de Thl7 en ausencia de citocinas añadidas de forma exógena. Además, tal diferenciación de Thl7 puede producirse in vivo.

[0550] En ciertos casos, la señal de estimulación primaria y la señal coestimuladora para las células T pueden ser proporcionadas mediante diferentes protocolos, tal como se ha descrito previamente.

[0551] En un ejemplo, los dos agentes se inmovilizan sobre perlas, ya sea en la misma perla, es decir, "cis", o en perlas separadas, es decir, "trans". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que proporciona la señal co-estimuladora es un anticuerpo anti-ICOS fragmento de unión a antígeno del mismo; y ambos agentes se co-inmovilizan en la misma perla en cantidades moleculares equivalentes. En un ejemplo, se utiliza una proporción de 1:1 de cada anticuerpo unido a las perlas para el crecimiento de Thl7. En ciertos aspectos de la presente descripción, se utiliza una relación de anticuerpos anti-CD3:ICOS unidos a las perlas de tal manera que se observa un aumento en la expansión de células Thl7 se observa en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. En un ejemplo, la relación de anticuerpo CD3:ICOS unido a las perlas varía de 100:1 a 1:100 y todos los valores enteros entre ellos. En un aspecto de la presente descripción, más anticuerpo anti-ICOS está unido a las partículas que el anticuerpo anti-CD3, es decir, la relación de CD3:ICOS es menor que uno. En cierto caso de la

descripción, la relación de anticuerpo anti ICOS con respecto a anticuerpo anti CD3 unido a las perlas es mayor que 2:1. En un particular ejemplo, se usa una relación 1:100 de CD3:ICOS de anticuerpo unido a las perlas. En otro ejemplo, se usa una relación 1:75 de CD3:ICOS de anticuerpo unido a las perlas. En u ejemplo adicional, se usa una relación 1:50 de CD3:ICOS de anticuerpo unido a las perlas. En otro ejemplo, se usa una relación 1:30 de CD3:ICOS de anticuerpo unido a las perlas. En un ejemplo, se usa una relación 1:10 de CD3:ICOS de anticuerpo unido a las perlas. En otro ejemplo, se usa una relación 3:1 de CD3:ICOS de anticuerpo unido a las perlas. En una realización preferida, se usa una relación 1:3 de CD3:ICOS de anticuerpo unido a las perlas.

[0552] Proporciones de partículas con respecto a células de 1:500 a 500:1 y cualesquiera de los valores enteros en el medio puede usarse para estimular las células T u otras células diana. Tal como los expertos en la técnica pueden entender fácilmente, la proporción de partículas con respecto a células puede depender del tamaño de partícula con respecto a la célula diana, tal como se describe previamente. Por ejemplo, perlas de tamaño pequeño sólo podrían unirse a unas pocas células, mientras que las perlas más grandes podrían unirse a muchas. En ciertos casos, la proporción de células con respecto a las partículas varía de 1:100 a 100:1, y cualquier valor entero en el medio y en otros casos la relación comprende de 1:9 a 9:1 y cualquier valor enteros en el medio, también se pueden utilizar para estimular células T. La relación de partículas acopladas a anti-CD3 y anti-ICOS con respecto a las células T que dan lugar a la estimulación de células T puede variar como se señaló anteriormente, sin embargo ciertos valores preferidos incluyen 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1,2:1,3:1,4:1,5:1,6:1,7:1,8:1,9:1, 10:1, y 15:1. Un experto en la técnica entenderá que una variedad de otras proporciones pueden ser adecuadas para su uso en la presente descripción. En particular, las proporciones pueden variar dependiendo del tamaño de las partículas y del tamaño de la célula y el tipo.

[0553] En otros ejemplos de la presente descripción, las células, tales como las células T, se combinan con las perlas recubiertas de agente, las perlas y las células se separan posteriormente, y después se cultivan las células. En un ejemplo alternativo, antes del cultivo, las perlas recubiertas de agente y las células no se separan, sino que se cultivan juntos. En un ejemplo adicional, las perlas y las células se concentran en primer lugar mediante la aplicación de una fuerza, tal como una fuerza magnética, que da lugar a un aumento de ligación de marcadores de superficie celular, induciendo de este modo la estimulación de células.

[0554] A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular se pueden ligar al permitir que las perlas paramagnéticas a las que están unidos anti-CD3 y anti-ICOS se pongan en contacto con las células T. En un ejemplo, las células (por ejemplo, de 10^4 a 10^9 células T) y las perlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas en una proporción de 1:1) se combinan en un tampón, preferiblemente PBS (sin cationes divalentes, tales como calcio y magnesio). Una vez más, los expertos en la técnica pueden entender fácilmente que puede utilizarse cualquier concentración de células. En un caso de la presente descripción, la mezcla puede ser cultivada durante varias horas (alrededor de 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor entero de horas en el medio. En otro caso, la mezcla puede ser cultivada durante 21 días. En un ejemplo de la descripción, las perlas y las células T se cultivan juntas durante aproximadamente ocho días. En otro caso, las perlas y las células T se cultivan juntas durante 2-3 días. También pueden ser deseables varios ciclos de estimulación, de tal manera que el tiempo de cultivo de las células T puede ser de 60 días o más.

[0555] En un ejemplo preferido, las células T que se polarizan a las células Th17 se cultivan en presencia de citocinas y otras moléculas que dan lugar a la polarización a las células Th17 y el mantenimiento del fenotipo y/o función de Th17. Ejemplos de tales citocinas incluyen: IL-1β (por ejemplo, 10 ng/ml), IL-4 (por ejemplo, 10 ng/ml), IL-23 (por ejemplo, 20 ng/ml). En algunos casos, se añade IL-2 1, 2, 3, 4, 5, o 6 días después de la activación hasta una concentración final de 50 UI/ml. Ejemplos de anticuerpos neutralizantes (por ejemplo, 10 μ/ml) para polarizar células Th17 incluyen: anticuerpos anti-IL-4 y anticuerpos anti-IFNγ.

[0556] Las condiciones apropiadas para el cultivo de células T17h incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o, X-vivo 15, (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y la viabilidad para mantener el fenotipo de Th17, incluyendo suero (por ejemplo, suero bovino fetal o suero humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-γ, IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF y TNF-a o cualesquiera de otros aditivos para el crecimiento de células conocidos por el experto en la materia. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero no se limitan a, agente tensioactivo, plasmanato y agentes, tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol reductor. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α-MEM, F-12, X-Vivo 15, y X-Vivo 20, Optimizer, con adición de aminoácidos, piruvato de sodio, y vitaminas, ya sea libre de suero o complementado con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y expansión de células T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomicina, se incluyen sólo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que han de ser infundidos en un sujeto. Las células diana se mantienen en condiciones necesarias para el crecimiento de apoyo, por ejemplo, una temperatura apropiada (por ejemplo, 37 °C) y la atmósfera apropiada (por ejemplo, aire más 5% de CO_2).

[0557] Los expertos en la técnica entenderán fácilmente que las metodologías de estimulación de células descritas en el presente documento pueden llevarse a cabo en una variedad de entornos (es decir, recipientes). Por ejemplo, dichos recipientes pueden ser matraces de cultivo, bolsas de cultivo, o cualquier recipiente capaz de contener

células, preferiblemente en un ambiente estéril. En un caso de la presente descripción, un biorreactor también es útil. Por ejemplo, varios fabricantes actualmente fabrican dispositivos que se pueden utilizar para hacer crecer células y usarse en combinación con los procedimientos de la presente descripción. Véase, por ejemplo, las patentes que cubren biorreactores tales como las patentes de los Estados Unidos. Nos. 6.096.532; 5.985.653; 5.888.807; 5.190.878.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y TRATAMIENTOS

[0558] Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción comprende uno o ambas de una célula T CD4+ que expresa CAR^{CD4+}, por ejemplo, una pluralidad de células T CD4+ que expresan CAR^{CD4+}, tal como se describe en el presente documento, y una célula T CD8+ que expresa CAR^{CD8+}, por ejemplo, una pluralidad de células T CD8+ que expresan CAR^{CD8+}, tal como se describe en el presente documento, en el que el CAR^{CD4+} y el CAR^{CD8+} son diferentes, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables,. Tales composiciones pueden comprender tampones, tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos, tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos, tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes, tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención son, en un aspecto, formuladas para administración intravenosa.

[0559] En una realización, la composición comprende además una segunda célula T CD8+ que comprende un segundo CAR^{CD8+}, en el que el segundo CAR^{CD8+} es diferente del primer CAR^{CD8+} y el CAR^{CD4+}. La célula T CD4+ que expresa CAR^{CD4+}, la célula T CD8+ que expresa CAR^{CD8+} y la célula T CD8+ que expresa un segundo CAR^{CD8+} pueden estar en la misma composición, o están cada uno en composiciones separadas. Cualquier combinación de célula T CD4+ que expresa CAR^{CD4+}, la célula T CD8+ que expresa CAR^{CD8+} y la célula T CD8+ que expresa un segundo CAR^{CD8+} puede estar en la misma composición o en diferentes composiciones.

[0560] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser administradas en una forma apropiada a la enfermedad a tratar (o prevenir). La cantidad y frecuencia de administración serán determinadas por factores, tales como la condición del paciente, y el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, aunque las dosis apropiadas pueden ser determinadas por ensayos clínicos.

[0561] En una realización, la composición farmacéutica está sustancialmente libre de, por ejemplo, no hay niveles detectables de, un contaminante, por ejemplo, seleccionados del grupo que consiste en endotoxina, micoplasma, lentivirus competente de replicación (RCL), p24, ácido nucleico VSV-G, gag de VIH, perlas recubiertas con anti-CD3/anti-CD28 residuales, anticuerpos de ratón, suero humano agrupado, albúmina de suero bovino, suero bovino, componentes de medios de cultivo, células de empaquetamiento de vectores o componentes de plásmido, una bacteria y un hongo. En una realización, la bacteria es al menos una seleccionado del grupo que consiste en Alcaligenes faecalis, Candida albicans, Escherichia coli, Haemophilus influenza, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae y Streptococcus pyogenes del grupo A.

[0562] Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente eficaz", "una cantidad eficaz antitumoral", "una cantidad eficaz inhibidora de tumores" o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención a administrar puede ser determinada por un médico con la consideración de las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y estado del paciente (sujeto). Por lo general, se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende las células T descritas en el presente documento se puede administrar a una dosis de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, en algunos casos de 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de células T también se pueden administrar varias veces en estas dosis. Las células se pueden administrar mediante el uso de técnicas de infusión que se conocen habitualmente en inmunoterapia (ver, por ejemplo, Rosenberg et al, New Eng J. of Med 319: 1676, 1988).

[0563] En ciertos aspectos, puede ser deseable administrar células T activadas a un sujeto y, posteriormente, volver a extraer sangre (o haber realizado una aféresis), activar las células T de la misma de acuerdo con la presente descripción, volver a infundir en el paciente con estas células T activadas y expandidas. Este proceso puede llevarse a cabo varias veces cada pocas semanas. En ciertos aspectos, las células T pueden ser activadas a partir de extracciones de sangre de desde 10 cc a 400 cc. En ciertos aspectos, las células T se activan de extracciones de sangre de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc o 100 cc.

[0564] La administración de las presentes composiciones se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo por inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implante o transplante. Las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar a un paciente mediante inyección transarterial, subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, mediante inyección intravenosa (iv) o intraperitoneal. En un aspecto, las composiciones de células T de la presente invención se administran a un paciente mediante inyección intradérmica o subcutánea. En un aspecto, las composiciones de células T de la presente invención se administran mediante inyección i.v. Las composiciones de células T pueden

ser inyectadas directamente en un tumor, nódulo linfático o sitio de la infección.

[0565] En un aspecto particular de ejemplo, los sujetos pueden someterse a leucoféresis, en el que los leucocitos se recogen, son enriquecidos, o agotados ex vivo para seleccionar y/o aislar las células de interés, por ejemplo, células T. Estos aislados de células T pueden expandirse mediante procedimientos conocidos en la técnica y se tratan de tal manera que se pueden introducir una o más construcciones de CAR de la presente descripción, creando de este modo una célula T CAR de la descripción. Los sujetos en necesidad de los mismos pueden someterse posteriormente a un tratamiento estándar con quimioterapia de alta dosis, seguido trasplante de células madre de sangre periférica. En ciertos aspectos, después o simultáneamente al trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células T CAR expandidas de la presente descripción. En un aspecto adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

[0566] En casos, se realiza un linfoagotamiento en un sujeto, por ejemplo, antes de administrar una o más células que expresan un CAR descrito en el presente documento, por ejemplo, un CAR de unión a CD20 descrito en el presente documento. En los ejemplos, el lingoagotamiento comprende la administración de uno o más de melfalán, citoxan, ciclofosfamida y fludarabina.

[0567] La dosificación de los tratamientos anteriores para ser administrada a un paciente variará con la naturaleza precisa de la condición o afección a tratar y el receptor del tratamiento. El escalado de las dosificaciones para administración humana se puede realizar de acuerdo con las prácticas aceptadas en la técnica. La dosis para CAMPATH, por ejemplo, generalmente estará en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, generalmente se administra diariamente durante un periodo entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es de 1 a 10 mg por día, aunque en algunos casos pueden utilizarse dosis más grandes de hasta 40 mg por día (descrito en la Patente de Estados Unidos Nº 6.120.766).

[0568] En un ejemplo, el CAR^{CD4+} se introduce en una célula T CD4+, y el CAR^{CD8+} se introduce en una célula T CD8+, en el que el CAR^{CD4+} y el CAR^{CD8+} son diferentes, por ejemplo, utilizando la transducción lentiviral. El sujeto (por ejemplo, humano) recibe una administración inicial de la célula T CD4+ que comprende el CAR^{CD4+} y la célula T CD8+ que comprende el CAR^{CD8+}, y uno o más de las administraciones posteriores de células T CD4+ y células T CD8+ de la descripción, en el que el uno o más administraciones posteriores se administran en menos de 15 días, por ejemplo, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, o 2 días después de la administración anterior. En un ejemplo, más de una administración de las células T CD4+ y células T CD8+ de la descripción se administran al sujeto (por ejemplo, humano) por semana, por ejemplo, 2, 3, o 4 administraciones de las células T CD4+ y células T CD8+ de la descripción se administran por semana. En una realización, el sujeto (por ejemplo, sujeto humano) recibe más de una administración de células T CD4+ y células T CD8+ por semana (por ejemplo, 2, 3 o 4 administraciones por semana) (también denominado en el presente documento como un ciclo), seguido por una semana sin administraciones de células T CD4+ y células T CD8+, y a continuación una o más administraciones adicionales de las células T CD4+ y células T CD8+ (por ejemplo, más de una administración de células T CD4+ y células T CD8+ por semana) se administran al sujeto. En otra realización, el sujeto (por ejemplo, sujeto humano) recibe más de un ciclo de células T CD4+ y células T CD8+, y el tiempo entre cada ciclo es menor de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, o 3 días. En una realización, las células T CD4+ y células T CD8+ se administran cada dos días durante 3 administraciones por semana. En un ejemplo, las células T CD4+ y células T CD8+ de la descripción se administran durante al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más semanas.

[0569] En un aspecto, los CART de la presente invención se generan utilizando vectores virales lentivirales, tales como lentivirus. Los CART generados de esta manera tendrán una expresión de CAR estable.

[0570] En un aspecto, los CART se generan utilizando un vector viral, tal como un vector gammaretroviral, por ejemplo, un vector gammaretroviral descrito en el presente documento. Los CART generados usando estos vectores pueden tener una expresión de CAR estable.

[0571] En un aspecto, los CART expresan transitoriamente vectores CAR durante 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 días después de la transducción. La expresión transitoria de los CAR puede efectuarse mediante el suministro del vector de ARN CAR. En un aspecto, el ARN CAR se introduce en la célula T mediante electroporación.

[**0572]** Un problema potencial que puede surgir en pacientes que están siendo tratados mediante células T CD4+ y células T CD8+ que expresan CAR que se expresan transitoriamente (particularmente con los CAR portadores de scFv murino) es la anafilaxis después de múltiples tratamientos.

[0573] Sin desear quedar ligado por esta teoría, se cree que dicha respuesta anafiláctica podría ser causada por un paciente que desarrolla una respuesta anti-CAR humoral, es decir, los anticuerpos anti-CAR que tienen un isotipo anti-IgE. Se cree que las células productoras de anticuerpos de un paciente experimentan un cambio de clase de isotipo IgG (que no causa anafilaxis) a isotipo IgE cuando hay una interrupción de diez a catorce días en la exposición al antígeno.

[0574] Si un paciente tiene un alto riesgo de generar una respuesta de anticuerpos anti-CAR durante el transcurso de la terapia CAR transitoria (tales como los generados por transducciones de ARN), las interrupciones de la infusión de CART no debe durar más de diez a catorce días.

[0575] También se proporcionan en el presente documento kits que comprenden uno o más, o todos de los siguientes componentes: una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR^{CD4+}, una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR^{CD8+}, y una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo CAR^{CD8+}, en el que el CAR^{CD4+}, el CAR^{CD8+} y el segundo CAR^{CD8+} son diferentes. Cada componente puede estar dispuesto en un recipiente separado. El kit comprende además agentes adicionales que pueden ser necesarios para la introducción en una célula T, tal como un reactivo de transfección, un reactivo de transducción, o un tampón.

[0576] También se proporcionan en el presente documento kits que comprenden uno o más, o todos los siguientes componentes: una célula T CD4+, o una preparación de la misma, que comprende un CAR^{CD4+}, una célula T CD8+, o una preparación de la misma, que comprende un CAR^{CD8+}, y una segunda célula T CD8+, o preparación de la misma, que comprende un segundo CAR^{CD8+}, en el que el CAR^{CD4+}, el CAR^{CD8+} y el segundo CAR^{CD8+} son diferentes. Cada uno de los componentes puede estar dispuesto en un recipiente separado. Los procedimientos de fabricación de dichos kits también se describen en el presente documento.

APLICACIONES TERAPÉUTICAS

[0577] En un aspecto, la presente descripción proporciona procedimientos para tratar una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno asociado a cáncer descrito en el presente documento.

[0578] En un aspecto, la presente descripción proporciona procedimientos de tratamiento de cáncer al proporcionar al sujeto en necesidad de los mismos de células T CD4+ y células T CD8+ que están diseñadas para expresar un XCAR, en el que X representa un antígeno tumoral (o antígeno asociado a cáncer), tal como se describe en el presente documento, y en el que las células cancerosas expresan dicho antígeno tumoral X (o antígeno asociado a cáncer).

[0579] En un aspecto, la presente descripción proporciona procedimientos de tratamiento de cáncer al proporcionar al sujeto en necesidad de los mismos células T CD4+ y células T CD8+ que se han diseñado para expresar un XCAR descrito en el presente documento, en el que las células cancerosas expresan X. En un ejemplo, X se expresa tanto en células normales como células de cáncer, pero se expresa a niveles más bajos en las células normales. En un ejemplo, el procedimiento comprende además la selección de un CAR que se une a X con una afinidad que permite a XCAR unirse y matar las células de cáncer que expresan X pero menos de 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o menos de las células normales que expresan X son eliminadas, por ejemplo, tal como se determina por un ensayo descrito en el presente documento. Por ejemplo, se puede utilizar el ensayo descrito en la Figura 14 o un ensayo de eliminación, tal como citometría de flujo basado en Cr51 CTL. En un ejemplo, el CAR seleccionado tiene un dominio de unióna antígeno que tiene una KD de afinidad de unión de 10^{-4} M a 10^{-8} M, por ejemplo, de 10^{-5} M a 10^{-7} M, por ejemplo, de 10^{-6} M o 10^{-7} M, para el antígeno diana. En un ejemplo, el dominio de unión a antígeno seleccionado tiene una afinidad de unión que es al menos cinco veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces o 1.000 veces menor que un anticuerpo de referencia, por ejemplo, un anticuerpo descrito en el presente documento.

[0580] En otro aspecto, se proporciona un procedimiento de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, para reducir o mejorar, una condición o trastorno hiperproliferativa (por ejemplo, un cáncer), por ejemplo, tumor sólido, un tumor de tejido blando, o una lesión metastásica, en un sujeto. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cáncer" se entiende que incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos, u órganos malignamente transformados, independientemente del tipo histopatológico o la etapa de invasividad. Ejemplos de tumores sólidos incluyen tumores malignos, por ejemplo, sarcomas, adenocarcinomas y carcinomas, de los diversos sistemas de órganos, tales como los que afectan el hígado, pulmón, mama, linfoide, gastrointestinal (por ejemplo, colon), tracto genitourinario (por ejemplo, renal, células uroteliales), próstata y faringe. Los adenocarcinomas incluyen tumores malignos, tales como la mayoría de los cánceres de colon, cáncer rectal, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, carcinoma de células no pequeñas del pulmón, cáncer del intestino delgado y cáncer del esófago. En un ejemplo, el cáncer es un melanoma, por ejemplo, un melanoma en etapa avanzada. Las lesiones metastásicas de los cánceres antes mencionados también pueden tratarse o prevenirse usando los procedimientos y composiciones de la descripción. Ejemplos de otros tipos de cáncer que pueden tratarse incluyen cáncer de huesos, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o el cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de pene, leucemias crónicas o agudas, incluyendo leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso

central (SNC), linfoma primario del SNC, la angiogénesis del tumor, tumor del eje espinal, glioma del tronco cerebral, adenoma de la pituitaria, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de células T, cánceres ambientalmente inducidos, incluyendo aquellos inducidos por amianto, y combinaciones de dichos cánceres. El tratamiento de cánceres metastásicos, por ejemplo, cánceres metastásicos que expresan PD-L1 (Iwai et al (2005) Int Immunol 17: 133-144) se puede efectuar usando las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento.

[0581] Los cánceres de ejemplo cuyo crecimiento puede inhibirse incluyen cánceres que típicamente responden a la inmunoterapia. Los ejemplos de cánceres no limitantes para el tratamiento incluyen melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico), cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células claras), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata hormono-refractario), cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas). Además, los tumores malignos refractarios o recurrentes pueden ser tratados utilizando las moléculas descritas en el presente documento.

[0582] En un aspecto, la presente descripción se refiere a un vector que comprende un CAR unido operativamente a promotor para la expresión en las células efectoras inmunitarias de mamíferos (por ejemplo, células T, células NK). En un aspecto, la descripción proporciona una célula T recombinante que expresa los CAR de la presente descripción para su uso en el tratamiento de cáncer que expresa un antígeno asociado cáncer, tal como se describe en el presente documento. En un aspecto, los CART de la descripción son capaces de poner en contacto una célula tumoral con al menos un antígeno asociado a cáncer expresado en su superficie, de tal manera que el CART reconoce la célula tumoral y el crecimiento del tumor es inhibido.

[0583] En un aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento de inhibir el crecimiento de un cáncer, que comprende poner en contacto la célula cancerosa con un CART de la presente descripción de tal manera que el CART se activa en respuesta al antígeno y reconoce la célula de cáncer, en el que se inhibe el crecimiento del tumor.

[0584] La presente descripción incluye un tipo de terapia celular, donde las células T se modifican genéticamente para expresar un receptor quimérico antígeno (CAR) y la célula CAR T se infunde a un receptor en necesidad del mismo. La célula infusa es capaz de matar células tumorales en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las células T modificadas con CAR, son capaces de replicarse in vivo dando lugar a una persistencia a largo plazo que puede conducir a un control tumoral sostenido. En diversos aspectos, las células T administradas al paciente, o su progenie, persisten en el paciente durante al menos cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, trece meses, catorce meses, quince meses, dieciséis meses, diecisiete meses, dieciocho meses, diecinueve meses, veinte meses, veintiún meses, veintidós meses, veintitrés meses, dos años, tres años, cuatro años, o cinco años después de la administración de la célula T al paciente.

[0585] La presente descripción también incluye un tipo de terapia celular donde se modifican las células T, por ejemplo, mediante un ARN transcrito in vitro, para expresar transitoriamente un receptor de antígeno quimérico (CAR) y la célula CAR T se infunde a un receptor en necesidad del mismo. La célula infusa es capaz de matar las células tumorales en el receptor. Por lo tanto, en varios aspectos, las células T administradas al paciente, están presentes durante menos de un mes, por ejemplo, tres semanas, dos semanas, una semana, después de la administración de la célula T al paciente.

[0586] Sin desear estar ligado por ninguna teoría en particular, la respuesta de inmunidad antitumoral provocada por las células T modificadas con CAR puede ser una respuesta inmunitaria activa o pasiva, o alternativamente puede ser debido a una respuesta inmunitaria directa vs indirecta. En un aspecto, las células T transducidas con CAR muestran una secreción de citocinas proinflamatorias específicas y la actividad citolítica potente en respuesta a las células de cáncer humano que expresan el antígeno asociado al cáncer, tal como se describe en el presente documento, resisten la inhibición de un antígeno soluble asociado un cáncer tal como se describe en el presente documento, median la eliminación “bystander” y median la regresión de un tumor humano establecido. Por ejemplo, las células tumorales de antígeno menos dentro de un campo heterogéneo de un tumor que expresa un antígeno asociado a cáncer, tal como se describe en el presente documento, puede ser susceptible a la destrucción indirecta por células T CD4+ y células T CD8+ redirigidas a un antígeno asociado a cáncer tal como se describe en el presente documento que ha reaccionado previamente contra las células cancerosas positivas al antígeno adyacente.

[0587] En un aspecto, las células T CD4+ y CD8+ modificadas con CAR totalmente humanas de la presente descripción pueden ser un tipo de vacuna para la inmunización ex vivo y/o en la terapia in vivo en un mamífero. En un aspecto, el mamífero es un humano.

[0588] Con respecto a la inmunización ex vivo, al menos una de las siguientes situaciones tiene lugar in vitro antes de la administración de la célula en un mamífero: i) expansión de las células, ii) introducción de un ácido nucleico que codifica un CAR a las células o iii) la crioconservación de las células.

[0589] Los procedimientos ex vivo son bien conocidos en la técnica y se discuten más completamente a

continuación. Brevemente, las células se aíslan de un mamífero (por ejemplo, un ser humano) y se modifican genéticamente (es decir, se transducen o transfectan in vitro) con un vector que expresa un CAR descrito en el presente documento. Los las células T CD4+ y CD8+ modificadas con CAR se pueden administrar a un mamífero recetor para proporcionar un beneficio terapéutico. El mamífero receptor puede ser un ser humano y las las células T CD4+ y CD8+ modificadas con CAR pueden ser autólogas con respecto al receptor. Alternativamente, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor.

[0590] En general, las células activadas y expandidas como se describe en el presente documento se pueden utilizar en el tratamiento y prevención de enfermedades que surgen en individuos que están inmunocomprometidos. En particular, las células T CD4+ y CD8+ modificadas con CAR de la presente descripción se utilizan en el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con la expresión de un antígeno asociado a cáncer como se describe en el presente documento. En ciertos aspectos, las células de la presente descripción se utilizan en el tratamiento de pacientes en riesgo de desarrollar enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con la expresión de un antígeno asociado a cáncer como se describe en el presente documento. Por lo tanto, la presente descripción proporciona procedimientos para el tratamiento o la prevención de enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con la expresión de un antígeno asociado a cáncer, tal como se describe en el presente documento, que comprenden administrar a un sujeto en necesidad del mismo, una cantidad terapéuticamente eficaz de las células T CD4+ y CD8+ modificadas con CAR de la presente descripción.

[0591] Las células T CD4+ y CD8+ modificadas con CAR de la presente descripción se pueden administrar ya sean solas, o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes, tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares.

Cáncer hematológico

[0592] Las afecciones de cáncer hematológico son los tipos de cáncer, tal como leucemia y afecciones linfoproliferativas malignas que afectan a la sangre, la médula ósea y el sistema linfático.

[0593] La leucemia puede ser clasificada como leucemia aguda y leucemia crónica. La leucemia aguda se puede clasificar además como leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia linfoide aguda (ALL). La leucemia crónica incluye la leucemia mielógena crónica (LMC) y la leucemia linfoide crónica (LLC). Otras enfermedades relacionadas incluyen síndromes mielodisplásicos (MDS, anteriormente conocido como "preleucemia"), que son una colección diversa de condiciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de las células sanguíneas mieloides y riesgo de transformación a AML.

[0594] La presente descripción proporciona composiciones y procedimientos para tratar el cáncer. En un aspecto, el cáncer es un cáncer hematológico, incluyendo, pero no se limita a, cáncer hematológico que es una leucemia o un linfoma. En un aspecto, las células CART de la presente descripción se pueden utilizar para tratar los cánceres y tumores malignos, tales como, pero no limitados a, por ejemplo, leucemias agudas, incluyendo, pero no limitadas a, por ejemplo, leucemia linfoide aguda de células B ("BALL"), leucemia linfoide aguda de células T ("TALL"), leucemia linfoide aguda (ALL); una o más leucemias cróncias, incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (CLL); cánceres hematológicos o condiciones hematológicas adicionales, incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, leucemia prolinfocítica de células B, neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células grandes o células pequeñas, condiciones linfoproliferativas malignos, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y el síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma plasmablástico, neoplasia de células dendríticas plasmacitoides, macroglobulinemia de Waldenstrom, y "preleucemia", que son una diversa colección de condiciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides, y similares. Además una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno asociado del cáncer tal como se describe en el presente documento, incluye, pero no limita a, por ejemplo, cánceres, tumores malignos, las condiciones precancerosas o enfermedades proliferativas que expresan un antígeno asociado acáncer tal como se describe en el presente documento, atípicos y/o no clásicos.

[**0595**] La presente descripción también proporciona procedimientos para inhibir la proliferación o reducir la población de células que expresan un antígeno asociado a cáncer tal como se describe en el presente documento, comprendiendo los procedimientos poner en contacto una población de células que comprenden células que expresan un antígeno asociado a cáncer tal como se describe en el presente documento con células T CD4+ y CD8+ que expresan CAR de la presente descripción que se une a la célula que expresa el antígeno asociado a cáncer tal como se describe en el presente documento. En un aspecto específico, la presente descripción proporciona procedimientos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan un antígeno asociado a cáncer, tal como se describe en el presente documento, comprendiendo los procedimientos poner en contacto una población de células cancerosas que expresan un antígeno asociado a cáncer tal como se describe en el presente documento con células T CD4+ y CD8+ que expresan CAR de la presente descripción que se une a la célula que expresa el antígeno asociado a cáncer tal como se describe en el presente documento. En un aspecto, la presente descripción proporciona procedimientos para inhibir la proliferación o reducir la población de

células cancerosas que expresan un antígeno asociado cáncer tal como se describe en el presente documento, comprendiendo los procedimientos poner en contacto una población de células cancerosas que expresan un antígeno asociado a cáncer tal como se describe en el presente documento con células T CD4+ y CD8+ que expresan CAR de la presente descripción que se une a la célula que expresa el antígeno asociado a cáncer tal como se describe en el presente documento. En ciertos aspectos, las células T CD4+ y CD8+ que expresan CAR de la presente descripción reducen la cantidad, número o porcentaje de células y/o células cancerosas en al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 65%, al menos 75%, al menos 85%, al menos 95%, o al menos 99% en un sujeto con o modelo animal para la leucemia mieloide u otro cáncer asociado con células que expresan un antígeno asociado a cáncer tal como se describe en relación con un control negativo. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

[**0596]** La presente descripción también proporciona procedimientos para prevenir, tratar y/o controlar una enfermedad asociada con células que expresan un antígeno asociado a cáncer tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, un cáncer hematológico o cáncer atípico que expresa un antígeno asociado a cáncer, tal como se describe en el presente documento), comprendiendo los procedimientos administrar a un sujeto en necesidad de las células T CD4+ y Cd8+ que expresan CAR que se une a células que expresan un antígeno asociado a cáncer tal como se describe en el presente documento. En un aspecto, el sujeto es un ser humano. Ejemplos no limitativos de trastornos asociados con células que expresan un antígeno asociado a cáncer incluyen trastornos autoinmunes (tales como lupus), trastornos inflamatorios (tales como alergias y asma) y cánceres (tales como cánceres hematológicos o cánceres atípicos que expresan un antígeno asociado a cáncer tal como se describe en el presente documento).

[0597] En algunos casos, un cáncer que puede ser tratado con CART de la presente descripción es el mieloma múltiple. El mieloma múltiple es un cáncer de la sangre, caracterizado por la acumulación de un clon de células plasmáticas en la médula ósea. Las terapias actuales para el mieloma múltiple incluyen, pero no se limitan a, el tratamiento con lenalidomida, que es un análogo de la talidomida. La lenalidomida tiene actividades que incluyen la actividad anti-tumoral, la inhibición de la angiogénesis y la inmunomodulación. Generalmente, se cree que las células de mieloma son negativas para la expresión de un antígeno asociado cáncer como se describe en el presente documento mediante citometría de flujo. Por lo tanto, en algunos casos, un CAR CD19, por ejemplo, como se describe en el presente documento, puede ser utilizado para reconocer células de mieloma. En algunos casos, la terapia con CAR de la presente descripción se puede utilizar en combinación con una o más terapias adicionales, por ejemplo, tratamiento con lenalidomida.

[0598] La presente descripción también proporciona procedimientos para prevenir, tratar y/o controlar una enfermedad asociada con un antígeno asociado a cáncer tal como células descritas en el presente documento que expresan, comprendiendo los procedimientos administrar a un sujeto en necesidad células T CD4+ y CD8+ que expresan CAR de la presente descripción que se unen al antígeno asociado cáncer como la célula que expresa en el presente documento. En un aspecto, el sujeto es un humano.

[0599] La presente descripción proporciona procedimientos para prevenir la recaída del cáncer asociado con células que expresan un antígeno asociado a cáncer tal como se describe en el presente documento, comprendiendo los procedimientos administrar a un sujeto en necesidad del mismo las células T CD4+ y CD8+ que expresan CAR de la presente descripción que se une a células que expresan el antígeno asociado a cáncer tal como se describe en el presente documento. En un aspecto, los procedimientos comprenden administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de las células T CD4+ y CD8+ que expresan CAR de la presente descripción que se une a células que expresan el antígeno asociado a cáncer tal como se describe en el presente documento en combinación con una cantidad eficaz de otro tratamiento.

TERAPIAS DE COMBINACIÓN

[0600] Los células T CD4+ y CD8+ que expresan CAR descritas en el presente documento pueden usarse en combinación con otros agentes y terapias conocidos. Administrado "en combinación", tal como se usa en el presente documento, significa que se aplican dos (o más) tratamientos diferentes al sujeto durante el transcurso de la aflicción del sujeto con el trastorno, por ejemplo, los dos o más tratamientos se aplican después de que el sujeto haya sido diagnosticado con el trastorno y antes de que el trastorno se haya curado o eliminado o el tratamiento haya cesado por otras razones. En algunas realizaciones, la aplicación de un tratamiento es aún realizándose cuando empieza la aplicación del segundo, de modo que hay una superposición en términos de administración. Esto a veces se denomina en el presente documento como "simultáneo" o "suministro o aplicación concurrente". En otras realizaciones, la aplicación de un tratamiento termina antes de que comience la aplicación del otro tratamiento. En algunas realizaciones de cualquiera de los ejemplos, el tratamiento es más eficaz debido a la administración combinada. Por ejemplo, el segundo tratamiento es más eficaz, por ejemplo, se observa un efecto equivalente con menos del segundo tratamiento, o el segundo tratamiento reduce los síntomas en un grado mayor, que lo que se observaría si el segundo tratamiento se administrara en ausencia del primer tratamiento, o se observa la situación análoga con el primer tratamiento. En algunas realizaciones, la aplicación es tal que la reducción de un síntoma, o de otro parámetro relacionado con el trastorno, es mayor que el que se observa con un solo tratamiento administrado en ausencia del otro. El efecto de los dos tratamientos puede ser parcialmente aditivo, totalmente

aditivo, o más que aditivo. La aplicación puede ser tal que un efecto del primer tratamiento aplicado es todavía detectable cuando se aplica el segundo.

[0601] Las células T CD4+ y CD8+ que expresan CAR descritas en el presente documento y el al menos un agente terapéutico adicional pueden administrarse simultáneamente, en la misma o en composiciones separadas, o secuencialmente. Para la administración secuencial, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento se puede administrar primero y el agente adicional se puede administrar segundo, o el orden de administración puede invertirse.

[0602] La terapia CAR y/o otros agentes terapéuticos, procedimientos o modalidades se pueden administrar durante períodos de trastorno activo, o durante un período de remisión o enfermedad menos activa. La terapia CAR se puede administrar antes de otro tratamiento, simultáneamente con el tratamiento, post-tratamiento, o durante la remisión de la enfermedad.

[0603] Cuando se administran en combinación, la terapia de CAR y el agente adicional (por ejemplo, segundo o tercer agente), o la totalidad, se pueden administrar en una cantidad o dosis que es mayor, menor o la misma que la cantidad o la dosis de cada agente utilizado individualmente, por ejemplo, como monoterapia. En ciertas realizaciones, la cantidad o la dosis de la terapia CAR, el agente adicional (por ejemplo, segundo o tercer agente), o la totalidad, es menor (por ejemplo, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, o al menos el 50%) que la cantidad o la dosis de cada agente utilizado individualmente, por ejemplo, como una monoterapia. En otras realizaciones, la cantidad o la dosis de la terapia CAR, el agente adicional (por ejemplo, segundo o tercer agente,), o la totalidad, que da lugar a un efecto deseado (por ejemplo, el tratamiento de cáncer) es más bajo (por ejemplo, al menos 20% , al menos 30%, al menos 40%, o al menos 50% menor) que la cantidad o la dosis de cada agente utilizado individualmente, por ejemplo, como una monoterapia, requerida para conseguir el mismo efecto terapéutico.

[0604] En aspectos adicionales, las células T CD4+ y CD8+ que expresan CAR descritas en el presente documento pueden usarse en un régimen de tratamiento en combinación con cirugía, quimioterapia, radiación, un inhibidor de la vía de mTOR, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato, y FK506, anticuerpos, u otros agentes immunoablativos, tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias con anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas, y la irradiación, vacuna de péptido, tal como se describe en Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108: 963-971.

[0605] En un ejemplo, las células T CD4+ y CS8+ que expresan CAR descritas en el presente documento pueden usarse en combinación con un agente quimioterapéutico. Agentes quimioterapéuticos de ejemplo incluyen una antraciclina (por ejemplo, doxorubicina (por ejemplo, doxorrubicina liposomal)). un vinca alcaloide (por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina), un agente alquilante (por ejemplo, ciclofosfamida, decarbazina, melfalán, ifosfamida, temozolomida), un anticuerpo de células inmunes (por ejemplo, alemtuzamab, gemtuzumab, rituximab, tositumomab), un antimetabolito (incluyendo, por ejemplo, antagonistas del ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina desaminasa (por ejemplo, fludarabina)), un inhibidor de mTOR, agonista de proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides (GITR), un inhibidor de proteasoma (por ejemplo, aclacinomicina A, gliotoxina o bortezomib), un inmunomodulador, tal como talidomida o un derivado de la talidomida (por ejemplo, lenalidomida).

[0606] Los agentes quimioterapéuticos general considerados para su uso en terapias de combinación incluyen anastrozol (Arimidex®), bicalutamida (Casodex®), sulfato de bleomicina (Blenoxane®), busulfan (Myleran®), busulfán en inyección (Busulfex®), capecitabina (Xeloda®), N4-pentoxicarbonilo-5-desoxi-5-fluorocitidina, carboplatino (Paraplatin®), carmustina (BiCNU®), clorambucilo (Leukeran®), cisplatino (Platinol®), cladribina (Leustatin®), ciclofosfamida (Cytoxan® o Neosar®), citarabina, arabinósido de citosina (Cytosar-U®), liposoma de citarabina para inyección (DepoCyt®), dacarbazina (DTIC-Dome®), dactinomicina (actinomicina D, Cosmegan), daunorrubicina en clorhidrato (Cerubidine®), liposomas de citrato de daunorrubicina para inyección (DaunoXome ®), dexametasona, docetaxel (Taxotere®), doxorubicina en clorhidrato (Adriamycin®, Rubex®), etopósido (VePesid®), fosfato de fludarabina (Fludara®), 5-fluorouracilo (Adrucil®, Efudex®), flutamida (Eulexin®), tezacitibina, gemcitabina (difluorodesoxicitidina), hidroxiurea (Hydrea®), idarrubicina (Idamycin®), ifosfamida (Ifex®), irinotecan (Camptosar®), L-asparaginasa (Elspar®), leucovorina de calcio, melfalán (Alkeran®), 6-mercaptopurina (Purinethol®), metotrexato (Folex ®), mitoxantrona (Novantrone®), Mylotarg, paclitaxel (Taxol®), Phoenix (itrio90/MX-DTPA), pentostatina, polifeprosan 20 con implante de carmustina (Gliadel®), citrato de tamoxifeno (Nolvadex®), tenipósido (Vumon®) , 6-tioguanina, tiotepa, tirapazamina (Tirazone®), clorhidrato de topotecan para inyección (Hycamptin®), vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), y vinorelbina (Navelbine®).

[0607] Los agentes alquilantes de ejemplo incluyen, sin limitación, mostazas de nitrógeno, derivados de etilenimina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas y triazenos): mostaza de uracilo (Aminouracil Mustard®, Chlorethaminacil®, Demetildopan®, Desmetildopan®, Haemanthamine®, Nordopan®, Uracil Nitrogen Mustard®, Uracillost®, Uracilmostaza®, Uramustin®, Uramustine®), clormetina (Mustargen®), ciclofosfamida (Cytoxan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procytox®, Revimmune™), ifosfamida (Mitoxana®), melfalán (Alkeran®), clorambucilo (Leukeran®), pipobromán (Amedel®, Vercyte®), trietilenmelamina (Hemel®, Hexalen®, Hexastat®),

Trietilentiofosforamina, temozolomida (Temodar®), tiotepa (Thioplex®), busulfán (Busilvex®, Myleran®), carmustina (BiCNU®), lomustina (CeeNU®), estreptozocina (Zanosar®) y dacarbazina (DTIC-Dome®). Agentes de alquilación de ejemplo adicionales incluyen, sin limitación, oxaliplatino (Eloxatin®); Temozolomida (Temodar® y Temodal®); Dactinomicina (también conocido como actinomicina-D, Cosmegen®); Melfalán (también conocido como L-PAM, L-sarcolisina, y mostaza de fenilalanina, Alkeran®); Altretamina (también conocido como hexametilmelamina (HMM), Hexalen®); carmustina (BiCNU®); Bendamustina (Treanda®); Busulfán (Busulfex® y Myleran®); Carboplatino (Paraplatin®); Lomustina (también conocido como CCNU, CeeNU®); cisplatino (también conocido como CDDP, Platinol® y Platinol®-AQ); Clorambucilo (Leukeran®); Ciclofosfamida (Cytoxan® y Neosar®); Dacarbazina (también conocido como DTIC, DIC e imidazol carboxamida, DTIC-Dome®); Altretamina (también conocido como hexametilmelamina (HMM), Hexalen®); Ifosfamida (Ifex®); Prednumustine; Procarbazina (Matulane®); Mecloretamina (también conocido como mostaza de nitrógeno, mustina y clorhidrato de mecloroetamina, Mustargen®); Estreptozocina (Zanosar®); Tiotepa (también conocido como tiofosfoamida, TESPA y TSPA, Thioplex®); ciclofosfamida (Endoxan®, Cytoxan®, Neosar®, Procytox®, Revimmune®); y bendamustina HCl (Treanda®).

[0608] Los inhibidores de mTOR de ejemplo incluyen, por ejemplo, temsirolimus; ridaforolimus (formalmente conocido como deferolimus, (1R, 2R, 4S)-4-[(2R)-2 [(1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28Z, 30S, 32S, 35R)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo [30.3.1.$0^{4,9}$]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexil dimetilfosfinato, también conocido como AP23573 y MK8669, y descrito en la publicación PCT No. WO 03/064383); everolimus (Afinitor® o RAD001); rapamicina (AY22989, Sirolimus®); simapimod (CAS 164301-51-3); emsirolimus, (5-{2,4-bis[(3S)-3-metilmorfolin-4-il] pirido [2,3-d] pirimidin-7-il}-2-metoxifenil) metanol (AZD8055); 2-amino-8-[trans-4-(2-hidroxietoxi) ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metil-pirido [2,3-d] pirimidin-7(8H)-ona (PF04691502, CAS 1013101-36-4); y N^2-[1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4H-1-benzopiran-2-il) morfolinio-4-il] metoxi] butil]-L-arginilglicil-L-α-aspartilL-serina (SEQ ID NO: 84), sal interna (SF1126, CAS 936487-67-1) y XL765.

[0609] Los ejemplos de inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, afutuzumab (disponible de Roche®); pegfilgrastim (Neulasta®); lenalidomida (CC-5013, Revlimid®); talidomida (Thalomid®), actimid (CC4047); y IRX-2 (mezcla de citocinas humanas, incluyendo la interleucina 1, interleucina 2, y el interferón γ, CAS 951209-71-5, disponible de IRX Therapeutics).

[0610] Los ejemplos de antraciclinas incluyen, por ejemplo, doxorrubicina (Adriamycin® y Rubex®); bleomicina (lenoxane®); daunorrubicina (clorhidrato de daunorrubicina, daunomicina, y clorhidrato de rubidomicina, Cerubidine®); daunorrubicina liposomal (liposoma de citrato de daunorrubicina, DaunoXome®); mitoxantrona (DHAD, Novantrone®); epirubicina (Ellence™); idarrubicina (Idamycin®, Idamycin PFS®); mitomicina C (Mutamycin®); geldanamicina; herbimicina; ravidomicina; y desacetilravidomcina.

[0611] Los vinca alcaloides de ejemplo incluyen, por ejemplo, tartrato de vinorelbina (Navelbine®), vincristina (Oncovin®), y vindesina (Eldisine®)); vinblastina (también conocido como sulfato de vinblastina, vincaleucoblastina y VLB, Alkaban-AQ® y Velban®); y vinorelbina (Navelbine®).

[0612] Los inhibidores de proteosomas de ejemplo incluyen bortezomib (Velcade®); carfilzomib (PX-171-007, (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il) amino)-1-oxo-3-fenil-propan-2-il)-2-((S)-2-(2-morpholinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida); marizomib (NPI-0052); citrato de ixazomib (MLN-9708); delanzomib (CEP-18770); y O-metil-N-[(2-metil-5-tiazolil) carbonil] -L-seril-O-metil-N-[(1S)-2-[(2R)-2-metil-2-oxiranilo]-2-oxo-1-(fenilmetil) etil]-L-serinamida (ONX-0912).

[0613] En un ejemplo, las células que expresan un CAR descritas en el presente documento se administran a un sujeto en combinación con una molécula que reconoce GITR y/o modula las funciones de GITR, tales como un agonista de GITR y/o un anticuerpo de GITR que reduce las células T reguladoras (Treg). En un ejemplo, las moléculas de unión a GITR y/o moléculas que modulan las funciones de GITR (por ejemplo, agonista de GITR y/o anticuerpos de GITR que reducen Treg) se administran antes de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, en un ejemplo, el agonista de GITR se puede administrar antes de la aféresis de las células. En un ejemplo, el sujeto tiene CLL.

[0614] Los agonistas de GITR de ejemplo incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión a GITR y anticuerpos anti-GITR (por ejemplo, anticuerpos bivalentes anti-GITR) tales como, por ejemplo, una proteína de fusión a GITR descrita en la patente de Estados Unidos No.: 6.111.090, la Patente Europea No.: 090505B1, Patente de Estados Unidos No.: 8.586.023, las publicaciones PCT Nos.: WO 2010/003118 y 2011/090754, o un anticuerpo anti-GITR descrito, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No.: 7.025.962, la Patente Europea No.: 1947183B1, Patente de Estados Unidos No.: 7.812.135, Patente de Estados Unidos No.: 8.388.967, Patente de Estados Unidos No.: 8.591.886, la Patente Europea No.: EP 1.866.339, la publicación PCT No.: WO 2011/028683, la publicación PCT No.: WO 2013/039954, la publicación PCT No.: WO2005/007190, la publicación PCT No.: WO 2007/133822, la publicación PCT No.: WO2005/055808, la publicación PCT No.: WO 99/40196, publicación PCT No.: WO 2001/03720, la publicación de PCT No.: WO99/20758, la publicación PCT No.: WO2006/083289, la publicación PCT No.: WO 2005/115451, patente de Estados Unidos No.: 7.618.632, y la publicación PCT No.: WO 2011/051726.

[0615] En un ejemplo, las CARX descritas en el presente documento se administran a un sujeto en combinación con una molécula que disminuye la población de células Treg. Los procedimientos que disminuyen el número de (por ejemplo, agotan) las células Treg son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, agotamiento de CD25, la administración de ciclofosfamida y la modulación de la función de GITR. Sin desear estar ligado por la teoría, se cree que la reducción del número de células Treg en un sujeto antes de la aféresis o antes de la administración de una célula que expresa CAR descrito en el presente documento reduce el número de células inmunitarias no deseadas (por ejemplo, células T reguladoras) en el microambiente tumoral y reduce el riesgo del sujeto de recaída. En un ejemplo, las células CARX descritas en el presente documento se administran a un sujeto en combinación con una molécula que reconoce GITR y/o modula las funciones de GITR, tal como un agonista de GITR y/o un anticuerpo para GITR que reduce las células T reguladoras (Treg). En un ejemplo, las células CARX descritas en el presente documento se administran a un sujeto en combinación con ciclofosfamida. En un ejemplo, la molécula de unión a GITR y/o la molécula que modula la función de GITR (por ejemplo, agonista de GITR y/o anticuerpos para GITR que agotan Treg) se administran antes de las células CARX. Por ejemplo, en un caso, el agonista de GITR se puede administrar antes de la aféresis de las células. En ejemplos, la ciclofosfamida se administra al sujeto antes de la administración (por ejemplo, infusión o reinfusión) de la célula que expresa CAR o antes de la aféresis de las células. En ejemplos, la ciclofosfamida y un anticuerpo anti-GITR se administran al sujeto antes de la administración (por ejemplo, infusión o reinfusión) de la célula que expresa CAR o antes de la aféresis de las células. En un caso, el sujeto tiene cáncer (por ejemplo, un cáncer sólido o un cáncer hematológico, tal como ALL o CLL). En un caso, el sujeto tiene CLL. En ejemplos, el sujeto tiene un cáncer sólido, por ejemplo, un cáncer sólido descrito en el presente documento.

[0616] En un ejemplo, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de mTOR, por ejemplo, un inhibidor de mTOR descrito en el presente documento, por ejemplo, un rapálogo, tal como everolimus. En un ejemplo, el inhibidor de mTOR se administra antes de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, en un ejemplo, el inhibidor de mTOR puede ser administrado antes de la aféresis de las células. En un ejemplo, el sujeto tiene CLL.

[0617] En un ejemplo, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un agonista de GITR, por ejemplo, un agonista de GITR descrito en el presente documento. En un ejemplo, el agonista de GITR se administra antes de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, en un ejemplo, el agonista de GITR se puede administrar antes de la aféresis de las células. En un ejemplo, el sujeto tiene CLL.

[0618] En un ejemplo, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede usarse en combinación con un inhibidor de quinasa. En un ejemplo, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de CDK4, por ejemplo, un inhibidor de CDK4 que se describe en el presente documento, por ejemplo, un inhibidor de CDK4/6, tal como, por ejemplo, 7-ciclopentil-N, N-dimetil-2-((5-(piperazin-1-il) piridin-2-il) amino) 7H-pirrolo [2,3-d] pirimidina-6-carboxamida (también referido como LEE011) o 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido [2,3-d] pirimidin-7-ona, clorhidrato (también denominado como palbociclib o PD0332991). En un ejemplo, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de BTK, por ejemplo, un inhibidor de BTK descrito en el presente documento, tal como, por ejemplo, ibrutinib. En un ejemplo, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de mTOR, por ejemplo, un inhibidor de mTOR descrito en el presente documento, tal como, por ejemplo, rapamicina, un análogo de rapamicina, OSI-027. El inhibidor de mTOR puede ser, por ejemplo, un inhibidor de mTORC1 y/o un inhibidor de mTORC2, por ejemplo, un inhibidor de mTORC1 y/o inhibidor de mTORC2 descritos en el presente documento. En un ejemplo, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de MNK, por ejemplo, un inhibidor de MNK descrito en el presente documento, tal como, por ejemplo, 4-amino-5-(4-fluoroanilino)pirazolo [3,4-d] pirimidina. El inhibidor de MNK puede ser, por ejemplo, un inhibidor de MNK1a, MNK1b, Mnk2a y/o Mnk2b.

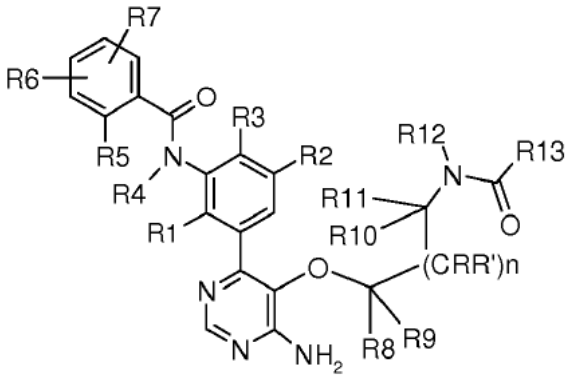
[0619] En un ejemplo, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de CDK4 seleccionado de 7-ciclopentil-N, N-dimetil-2 -((5-(piperazin-1-il)piridin-2-il)amino)7H-pirrolo [2,3-d] pirimidina-6-carboxamida (también referido como LEE011); aloisina A; flavopiridol o HMR-1275, 2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-[(3S, 4R)-3-hidroxi-1-metil-4-piperidinil]-4-cromenona; crizotinib (PF-02341066; 2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-[(2R, 3S)-2-(hidroximetil)-1-metil-3-pirrolidinil] 4H-1-benzopiran-4-ona, clorhidrato (P276-00); 1-metil-5-[[2-[5-(trifluorometil)-1H-imidazol-2-il]-4-piridinil]oxi]-N-[4-(trifluorometil)fenil]-1H-bencimidazol-2-amina (RAF265); indisulam (E7070); roscovitina (CYC202); palbociclib (PD0332991); dinaciclib (SCH727965); N-[5-[[(5-terc-butyloxazol- 2-il) metil] tio] tiazol-2-il] piperidina-4-carboxamida (BMS 387032); ácido 4-[[9-cloro-7-(2,6-difluorofenil)-5H-pirimido [5,4 d] [2] benzazepin-2-il] amino] benzoico (MLN8054); 5-[3-(4,6-difluoro-1H-bencimidazol-2-il)-1H-indazol-5-il]-N-etil-4-metil-3-piridinometanamina (AG-024322); N-(piperidin-4-il) amida del ácido 4-(2,6-diclorobenzoilamino)-1H-pirazol-3-carboxílico (AT7519); 4-[2-metil-1-(1-metiletil)-1H-imidazol-5-il] -N-[4-(metilsulfonil) fenil] -2-pirimidinamina (AZD5438); y XL281 (BMS908662).

[0620] En un ejemplo, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de CDK4, por ejemplo, palbociclib (PD0332991), y el palbociclib se administra a una dosis de aproximadamente 50 mg, 60 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 105 mg, 110 mg, 115 mg, 120 mg, 125 mg, 130 mg, 135 mg (por ejemplo, 75 mg, 100 mg o 125 mg) diariamente durante un período de tiempo, por ejemplo, diariamente durante 14-21 días de un ciclo de 28 días, o diariamente durante 7-12 días de un ciclo de 21 días. En un ejemplo, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de palbociclib.

[0621] En un ejemplo, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de BTK seleccionado de ibrutinib (PCI-32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; y LFM-A13.

[0622] En un ejemplo, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de BTK, por ejemplo, ibrutinib (PCI-32765), y el ibrutinib se administra a una dosis de aproximadamente 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 420 mg, 440 mg, 460 mg, 480 mg, 500 mg, 520 mg, 540 mg, 560 mg, 580 mg, 600 mg (por ejemplo, 250 mg, 420 mg o 560 mg) diariamente durante un período de tiempo, por ejemplo, diariamente durante un ciclo de 21 días o diariamente durante un ciclo de 28 días. En un ejemplo, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de ibrutinib.

[0623] En algunos casos de los procedimientos, usos y composiciones de esta invención, el inhibidor de BTK es un inhibidor de BTK descrito en la Solicitud Internacional WO/2015/079417. Por ejemplo, en algunos casos, el inhibidor de BTK es un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



(I)

en la que
R1 es hidrógeno, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido por hidroxi;
R2 es hidrógeno o halógeno;
R3 es hidrógeno o halógeno;
R4 es hidrógeno;
R5 es hidrógeno o halógeno;
o R4 y R5 están unidos entre sí y representan un enlace, -CH2-, -CH2-CH2-, -CH=CH, -CH=CH-CH2-; -CH2-CH=CH-; o -CH2-CH2-CH2-;
R6 y R7 representan independientemente uno del otro H, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido por hidroxi, cicloalquilo C3-C6 opcionalmente sustituido por halógeno o hidroxi, o halógeno;
R8, R9, R, R', R10 y R11 independientemente entre sí representan H, o alquilo C1-C6 alquilo opcionalmente sustituido por alcoxi C1-C6; o cualesquiera dos de R8, R9, R, R', R10 y R11 junto con el átomo de carbono al que están unidos pueden formar un anillo carbocíclico saturado de 3-6 miembros;
R12 es hidrógeno o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido por halógeno o alcoxi C1-C6;
o R12 y cualquiera de R8, R9, R, R', R10 o R11 junto con los átomos a los que están unidos pueden formar un anillo azacíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros, cuyo anillo puede estar opcionalmente sustituido por halógeno, ciano, hidroxilo, alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6;
n es 0 o 1; y
R13 es alquenilo C2-C6 opcionalmente sustituido por alquilo C1-C6, alcoxi C1-C6 o N, N-di-alquil C1-C6 amino; alquinilo C2-C6 opcionalmente sustituido por alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; u óxido de alquilenilo C2-C6 opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6.

[0624] En algunos casos, el inhibidor de BTK de la Fórmula I se selecciona de entre: N-(3-(5-((1-Acriloilazetidin-3-il)oxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (E)-N-(3-(6-Amino-5-((1-(but-2-enoil) azetidin-3-il) oxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-((1-propioloilazetidin-3-il) oxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-((1-(but-2-inoil) azetidin-3-il) oxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(5-((1-Acriloilpiperidin-4-il) oxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilacrilamido) etoxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (E)-N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilbut-2-enamido) etoxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilpropiolamido) etoxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (E)-N-(3-(6-amino-5-(2-(4-metoxi-N-metilbut-2-enamido) etoxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)- 4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilbut-2-inamido) etoxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(2-((4-Amino-6-(3-(4-ciclopropil-2-fluorobenzamido)-5-fluoro-2-metilfenil)pirimidin-5-il)oxi)etil)-N-metiloxirano-2-carboxamida; N-(2-((4-Amino-6-(3-(6-ciclopropil-8-fluoro-1-oxoisoquinolin-2 (1H)-il) fenil) pirimidin-5-il) oxi) etil)-N-metilacrilamida; N-(3-(5-(2-Acrilamidoetoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-

fluorobenzamida; N-(3-(6-amino-5-(2-(N-etilacrilamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-amino-5-(2-(N-(2-fluoroetilo) acrilamido) etoxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(5-((1-Acrilamidociclopropil) metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(5-(2-Acrilamidopropoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(6-amino-5-(2-(but-2-inamido) propoxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2- fluorobenzamida; (S)-N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilacrilamido) propoxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilbut-2-inamido) propoxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil- 2-fluorobenzamida; N-(3-(6-amino-5-(3-(N-metilacrilamido) propoxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(5-((1-Acriloilpirrolidin-2-il) metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(6-Amino-5-((1-(but-2-inoil) pirrolidin-2-il) metoxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-2-(3-(5-(1-Acriloilpirrolidin-2-il) metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-((hidroximetil)fenil-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1 (2H)-ona; N-(2-((4-Amino-6-(3-(6-ciclopropil-1-oxo-3,4-dihidroisoquinolin-2 (1H)-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil) fenil) pirimidin-5-il) oxi) etil)-N-metilacrilamida; N-(3-(5-(((2S, 4R)-1-acriloil-4-metoxipirrolidin-2-il) metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-(((2S, 4R)-1-(but-2-inoil)-4-metoxipirrolidin-2-il) metoxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; 2-(3-(5-(((2S, 4R)-1-acriloil-4-metoxipirrolidin-2-il) metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil) fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1 (2H)-ona; N-(3-(5-(((2S, 4S)-1-acriloil-4-metoxipirrolidin-2-il) metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-amino-5-(((2S, 4S)-1-(but-2-inoil)-4-metoxipirrolidin-2-il) metoxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(5-(((2S, 4R)-1-acriloil-4-fluoropirrolidin-2-il) metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-(((2S, 4R)-1-(but-2-inoil)-4-fluoropirrolidin-2-il) metoxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(5-((1-Acriloilazetidin-2-il) metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida ;(S)-N-(3-(6-Amino-5-((1-propioloilazetidin-2-il) metoxi) pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2- fluorobenzamida; (S)-2-(3-(5-(((hidroximetil) fenil 1-Acriloilazetidin-2-il) metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-fluoro-2--5)-6-ciclopropil- 3,4dihidroisoquinolin-1 (2H)-ona; (R)-N-(3-(5-((1-Acriloilazetidin-2-il) metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida ; (R)-N-(3-(5-((1-Acriloilpiperidin-3-il) metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida ; N-(3-(5-(((2R, 3S)-1-acriloil-3-metoxipirrolidin-2-il) metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(5-(((2S, 4R)-1-acriloil-4-cianopirrolidin-2-il) metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; o N-(3-(5-(((2S, 4S)-1-acriloil-4-cianopirrolidin-2-il) metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)- 4-ciclopropil-2-fluorobenzamida.

[0625] A menos que se indique lo contrario, los términos químicos utilizados anteriormente en la descripción del inhibidor de BTK de fórmula I se usan de acuerdo con sus significados tal como se establece en la Solicitud Internacional WO/2015/079417.

[0626] En un ejemplo, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de mTOR seleccionado de temsirolimus; ridaforolimus (1R, 2R, 4S)-4-[(2R)-2 [(1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28Z, 30S, 32S, 35R)- 1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo [30.3.1.$0^{4,9}$] hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexilo dimetilfosfinato, también conocido como AP23573 y MK8669; everolimus (RAD001); rapamicina (AY22989); simapimod; (5-{2,4-bis [(3S)-3-metilmorfolin-4-il] pirido [2,3-d]pirimidin-7-il}-2-metoxifenil) metanol (AZD8055); 2-mmino-8-[trans-4-(2-hidroxietoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metil-pirido [2,3-d] pirimidin-7(8H)-ona (PF04691502); y N^2-[1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4H-1-benzopiran-2-il)morfolinio-4-il] metoxi] butil]-L-arginilglicil-L-α-aspartil-serina (SEQ ID NO: 84), sal interna (SF1126); y XL765.

[0627] En un ejemplo, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de mTOR, por ejemplo, rapamicina, y la rapamicina se administra a una dosis de aproximadamente 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg (por ejemplo, 6 mg) diariamente durante un período de tiempo, por ejemplo, diariamente durante un ciclo de 21 días, o diariamente durante 28 días. En un ejemplo, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de rapamicina. En un ejemplo, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de mTOR, por ejemplo, everolimus y el everolimus se administra a una dosis de aproximadamente 2 mg, 2,5 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg (por ejemplo, 10 mg) diariamente durante un período de tiempo, por ejemplo, diariamente durante un ciclo de 28 días. En un ejemplo, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de everolimus.

[0628] En un ejemplo, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de MNK seleccionado de CGP052088; 4-amino-3-(p-fluoro-fenilamino)pirazolo [3,4-d] pirimidina (CGP57380); cercosporamida; ETC-1780445-2; y 4-amino-5-(4-fluoroanilino) pirazolo [3,4-d] pirimidina.

[0629] También se pueden utilizar fármacos que inhiben la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la p70S6 quinasa que es importante para la señalización inducida por factor de crecimiento (rapamicina). (Liu et al, Cell 66: 807-815, 1991; Henderson et al, Immun., 73: 316-321, 1991; Bierer et al, Curr Opin Immun 5: 763-773, 1993). En un aspecto adicional, las composiciones celulares de la presente invención se pueden administrar a un paciente en combinación con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después), trasplante de médula ósea, terapia ablativa de células T usando agentes de quimioterapia, tales como fludarabina, la terapia de radiación de haces externos (XRT), ciclofosfamida y/o anticuerpos, tales como OKT3 o CAMPATH. En un

aspecto, las composiciones celulares de la presente invención se administran después de la terapia ablativa de células B, tales como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en una realización, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con quimioterapia de alta dosis seguida, trasplante de células madre de sangre periférica. En ciertos casos, tras el trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente descripción. En un ejemplo adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

[0630] En algunos casos, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra en combinación con un virus oncolítico. En los ejemplos, los virus oncolíticos son capaces de replicarse selectivamente en y provocando la muerte de o ralentizar el crecimiento de una célula cancerosa. En algunos casos, los virus oncolíticos no tienen ningún efecto o un efecto mínimo sobre las células no cancerosas. Un virus oncolítico incluye, pero no está limitado a, un adenovirus oncolítico, virus del herpes simplex oncolítico, retrovirus oncolíticos, parvovirus oncolítico, virus vaccinia oncolítico, virus Sinbis oncolítico, virus de la gripe oncolítico, o virus de ARN oncolítico (por ejemplo, reovirus oncolítico, virus de la enfermedad Newcastle (NDV) oncolítico, virus del sarampión oncolítico o virus de la estomatitis vesicular (VSV) oncolítico).

[0631] En algunos casos, el virus oncolítico es un virus, por ejemplo, un virus oncolítico recombinante, que se describe en el documento US2010/0178684 A1. En algunos casos, un virus oncolítico recombinante comprende una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico heterólogo) que codifica un inhibidor de una respuesta inmunitaria o respuesta inflamatoria, por ejemplo, tal como se describe en US2010/0178684 A1. En los ejemplos, el virus oncolítico recombinante, por ejemplo, NDV oncolítico, comprende una proteína proapoptótica (por ejemplo, la apoptina), una citocina (por ejemplo, GM-CSF, interferón gamma, interleucina-2 (IL-2), factor de necrosis tumoral alfa), una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo contra fibronectina ED-B), un antígeno asociado a tumor, una proteína adaptadora biespecífica (por ejemplo, anticuerpo biespecífico o fragmento de anticuerpo dirigido contra la proteína HN de NDV y un receptor coestimulador de células T, tal como CD3 o CD28; o proteína de fusión entre la IL-2 humana y anticuerpo de cadena única dirigido contra la proteína HN de NDV). Véase, por ejemplo, Zamarin et al. Future Microbiol. 7.3 (2012): 347-67. En algunos casos, el virus oncolítico es un NDV oncolítico quimérico que describe en US 8.591.881 B2, US 2012/0122185 A1 o US 2014/0271677 A1.

[0632] En algunos casos, el virus oncolítico comprende un adenovirus condicionalmente replicativo (CRAd), que está diseñado para replicarse exclusivamente en células cancerosas. Véase, por ejemplo, Alemany et al. Nature Biotechnol. 18 (2000): 723-27. En algunos casos, un adenovirus oncolítico comprende uno descrito en la Tabla 1 en la página 725 de Alemany et al.

[0633] Los virus oncolíticos de ejemplo incluyen pero no se limitan a los siguientes:
Adenovirus oncolítico del grupo B (ColoAd1) (PsiOxus Terapéutica Ltd.) (véase, por ejemplo, Identificador de ensayos clínicos: NCT02053220);
Oncos-102 (anteriormente llamado CGTG-102), que es un adenovirus que comprende el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (Oncos Therapeutics) (véase, por ejemplo, Identificador de ensayos clínicos: NCT01598129);
VCN-01, que es un adenovirus humano oncolítico genéticamente modificado que codifican hialuronidasa PH20 humana (VCN Biosciences, SL) (véase, por ejemplo, Identificadores de ensayos clínicos: NCT02045602 y NCT02045589);
Adenovirus Condicionalmente replicativo ICOVIR-5, que es un virus derivado de adenovirus serotipo 5 (hAd5) humano de tipo salvaje que ha sido modificado para replicarse selectivamente en las células cancerosas con un mecanismo de retinoblastoma desregulado/E2F (Institut Català d'Oncologia) (véase, por ejemplo, Identificador de ensayos clínicos: NCT01864759);
Celyvir, que comprende células madre mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea (MSC) infectadas con ICOVIR5, un adenovirus oncolítico (Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, España/Ramón Alemany) (véase, por ejemplo, Identificador de ensayos clínicos: NCT01844661);
CG0070, que es un adenovirus de serotipo 5 oncolítico de condicionalmente replicativo (Ad5) en el que el promotor E2F-1 humano dirige la expresión de los genes virales E1a esenciales, restringiendo así la replicación viral y la citotoxicidad de células tumorales defectuosas del mecanismo de Rb (Cold Genesys, Inc.) (véase, por ejemplo, Identificador de ensayos clínicos: NCT02143804); o
DNX-2401 (anteriormente llamado Delta-24-RGD), que es un adenovirus que ha sido diseñado para replicar selectivamente en células deficientes del mecanismo de Rb de retinoblastoma y para infectar células que expresan ciertas integrinas de unión a RGD de manera más eficiente (Clinica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra/DNAtrix, Inc.) (véase, por ejemplo, de Identificador de ensayos clínicos: NCT01956734).

[0634] En algunos casos, un virus oncolítico descrito en el presente documento se administra por inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intra-arterial, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. En los ejemplos, un virus oncolítico descrito en el presente documento se administra por vía intratumoral, por vía transdérmica, transmucosa, oral, intranasal, o mediante administración pulmonar.

[0635] En una realización, se puede administrar al sujeto un agente que reduce o mejora un efecto secundario asociado con la administración de las células T CD4+ y células T CD8+ que expresan CAR. Los efectos secundarios

asociados con la administración de las células T CD4+ y células T CD8+ que expresan CAR incluyen, pero no se limitan a CRS, y linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH), también denominado síndrome de activación de macrófagos (MAS). Los síntomas de CRS incluyen fiebre alta, náuseas, hipotensión transitoria, hipoxia y similares. CRS puede incluir signos constitucionales clínicos y síntomas, tales como fiebre, fatiga, anorexia, mialgias, artralgias, náuseas, vómitos y dolor de cabeza. CRS puede incluir signos de la piel clínicos y síntomas, tales como erupción cutánea. CRS puede incluir signos gastrointestinales clínicos y síntomas, tales como náuseas, vómitos y diarrea. CRS puede incluir signos respiratorios clínicos y síntomas, tales como taquipnea e hipoxemia. CRS puede incluir signos cardiovasculares clínicos y síntomas, tales como taquicardia, presión de pulso ampliado, hipotensión, aumento del gasto cardiaco (temprano) y gasto cardiaco potencialmente disminuido (tardío). CRS puede incluir signos clínicos de coagulación y síntomas, tales como d-dímero elevado, hipofibrinogenemia con o sin sangrado. CRS puede incluir signos clínicos renales y síntomas, tales como azotemia. CRS puede incluir signos clínicos hepáticos y síntomas, tales como transaminasas e hiperbilirrubinemia. CRS puede incluir signos clínicos neurológicos y síntomas, tales como dolor de cabeza, cambios en el estado mental, confusión, delirio, dificultad para encontrar palabras o afasia franca, alucinaciones, temblores, dismetría, alteración de la marcha y convulsiones.

[0636] Por consiguiente, los procedimientos descritos en el presente documento pueden comprender administrar una célula que expresa CAR descrita en el presente documento a un sujeto y administrar adicionalmente uno o más agentes para controlar los niveles elevados de un factor soluble que resulta del tratamiento con las células T CD4+ y células T CD8+ que expresan CAR En un caso, el factor soluble elevados en el sujeto es uno o más de IFN-γ, TNFα, IL-2 e IL-6. En un caso, el factor elevado en el sujeto es uno o más de IL-1, GM-CSF, IL-10, IL-8, IL-5 y fraktalkine. Por lo tanto, un agente administrado para el tratamiento de este efecto secundario puede ser un agente que neutraliza uno o más de estos factores solubles. En una realización, el agente que neutraliza una o más de estas formas solubles es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a, un esteroide (por ejemplo, corticosteroide), un inhibidor de TNFα, y un inhibidor de IL-6. Un ejemplo de un inhibidor de TNFα es una molécula de anticuerpo anti-TNFa, tal como, infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, y golimumab. Otro ejemplo de un inhibidor de TNFα es una proteína de fusión, tal como entanercept. El inhibidor de molécula pequeña de TNFα incluyen, pero no se limita a, derivados de xantina (por ejemplo, pentoxifilina) y bupropion. Un ejemplo de un inhibidor de IL-6 es una molécula de anticuerpo anti-IL-6, tal como tocilizumab (toc), sarilumab, elsilimomab, CNTO 328, ALD518/BMS-945429, CNTO 136, CPSI-2364, CDP6038, VX30, ARGX-109, FE301, y FM101. En una realización, la molécula de anticuerpo anti-IL-6 es tocilizumab. Un ejemplo de un inhibidor basado en IL-1R es anakinra.

[0637] En los ejemplos, se administra una quimioterapia de linfoagotamiento al sujeto antes de, simultáneamente con, o después de la administración (por ejemplo, infusión) de células CAR, por ejemplo, células CD4+ o CD8+ descritas en el presente documento. En un ejemplo, la quimioterapia de linfoagotamiento se administra al sujeto antes de la administración de células CAR. Por ejemplo, la quimioterapia de linfoagotamiento termina 1-4 días (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4 días) antes de la infusión de células CAR. En los ejemplos, las dosis múltiples de células CAR se administran, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una dosis única comprende alrededor de 5 x 10^8 células CAR. En los ejemplos, se administra una quimioterapia de linfoagotamiento al sujeto antes de, simultáneamente con, o después de la administración (por ejemplo, infusión) de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento.

[0638] En algunos casos, las células CARX descritas en el presente documento (por ejemplo, células CAR^{CD4+} y/o células CAR^{CD8+}), se administran a un sujeto en combinación con una célula que expresa CAR CD19, por ejemplo, CTL019, por ejemplo, tal como se describe en WO2012/079.000, para el tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión de antígeno de cáncer, por ejemplo, un cáncer descrito en el presente documento. Sin estar ligado por la teoría, se cree que la administración de una célula que expresa CAR CD19 en combinación con otra célula que expresa CAR mejora la eficacia de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento al reconocer células cancerosas de linaje temprano, por ejemplo, células madre de cáncer, modular la respuesta inmunitaria, agotar las células B regulatorias y/o mejorar el microambiente tumoral. Por ejemplo, una células que expresa CAR CD19 reconoce células de cáncer que expresan marcadores tempranos de linaje, por ejemplo, células madre de cáncer y células que expresan CD19, mientras que la otra célula que expresa CAR descrita en el presente documento reconoce células cancerosas que expresan marcadores de linaje posterior, por ejemplo, CD33. Este enfoque de preacondicionamiento puede mejorar la eficacia de la célula que expresa CAR descrita en el presente documento. En tales casos, la célula que expresa CAR CD19 se administra antes de, simultáneamente con, o después de la administración (por ejemplo, infusión) de la segunda célula que expresa CAR.

[0639] En realizaciones, una célula que expresa CAR que expresa un CAR que reconoce un antígeno de cáncer distinto de CD19 también expresa un CAR que reconoce CD19, por ejemplo, un CAR CD19. En una realización, la célula que expresa un CAR no CD 19 y un CAR CD19 se administra a un sujeto para tratamiento de un cáncer descrito en el presente documento, por ejemplo, AML. En una realización, las configuraciones de una o ambas de las moléculas CAR comprenden un dominio de señalización intracelular primario y un dominio coestimulador de señalización. En otra realización, las configuraciones de una o ambas de las moléculas CAR comprenden un dominio de señalización intracelular primaria y dos o más, por ejemplo, 2, 3, 4, o 5 o más, dominios coestimuladores de señalización. En tales realizaciones, la molécula de CAR no CD19 y CAR CD19 pueden tener el mismo o un

dominio de señalización intracelular primaria diferente, los mismos o diferentes dominios coestimuladores de señalización o el mismo número o un número diferente de dominios coestimuladores de señalización. Alternativamente, el CAR no CD19 y el CAR CD19 se configuran como un CAR de división, en el que una de las moléculas CAR comprende un dominio de unión a antígeno y un dominio coestimulador (por ejemplo, 4-1BB), mientras que la otra molécula de CAR comprende un dominio de unión a antígeno y un dominio de señalización intracelular primaria (por ejemplo, CD3 zeta).

[0640] En un ejemplo, se puede administrar al sujeto un agente que mejora la actividad de las células T CD4+ y células T CD8+ que expresan CAR descrito en el presente documento. Por ejemplo, en un caso, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora, por ejemplo, el agente es un inhibidor de punto de control. Las moléculas inhibidoras, por ejemplo, muerte programada 1 (PD-1), pueden, en algunos casos, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR para montar una respuesta efectora inmunitaria. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, Gal9, adenosina, y TGFR beta, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento. La inhibición de una molécula inhibidora, por ejemplo, mediante la inhibición a nivel de ADN, ARN o proteína, puede optimizar el rendimiento de las células T CD4+ y células T CD8+ que expresan CAR. En realizaciones, un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo, un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo, un dsARN, por ejemplo, un siARN o shARN, repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas regularmente agrupadas (CRISPR), una nucleasa efectora similar a activador de la transcripción (TALEN), o una endonucleasa de dedo de zinc (ZFN), por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, se pueden utilizar para la expresión de inhibición de una molécula inhibidora en las células T CD4+ y células T CD8+ que expresan CAR. En una realización, el inhibidor es un shARN. En una realización, la molécula inhibidora es inhibida dentro de las células T CD4+ y células T CD8+ que expresan CAR. En estas realizaciones, una molécula de dsARN que inhibe la expresión de la molécula inhibidora está unida con el ácido nucleico que codifica un componente, por ejemplo, todos los componentes, del CAR.

[0641] En un caso, una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de dsARN que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de células T está unida operativamente a un promotor, por ejemplo, un promotor derivado de H1 o U6, de tal manera que la molécula de dsARN que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de células T se expresa, por ejemplo, se expresa dentro de una célula que expresa CAR. Véase, por ejemplo, Tiscornia G., "Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA", Capítulo 3, en Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA (eds Friedmann y Rossi.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, EE.UU., 2007; Brummelkamp TR, et al. (2002) Science 296: 550-553; Miyagishi M, et al. (2002) Nat. Biotechnol. 19: 497-500. En un caso, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de dsARN que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe la función de células T, está presente en el mismo vector, por ejemplo, un vector lentiviral, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un componente, por ejemplo, todos los componentes, del CAR. En tal caso, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de dsARN que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de células T se encuentra en el vector, por ejemplo, el vector lentiviral, 5' o 3' con respecto al ácido nucleico que codifica un componente, por ejemplo, todos los componentes, del CAR. La molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de dsARN que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de células T se puede transcribir en la misma o diferente dirección que el ácido nucleico que codifica un componente, por ejemplo, todos los componentes, del CAR. En un caso, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de dsARN que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe la función de células T, está presente en un vector distinto del vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un componente, por ejemplo, todos los componentes, del CAR. En una realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de dsARN que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de células T, se expresa transitoriamente dentro de una célula que expresa CAR. En una realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de dsARN que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de células T, está integrada de manera estable en el genoma de una célula que expresa CAR. En una realización, la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de células T es PD-1.

[0642] En un ejemplo, el inhibidor de una señal inhibidora puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a una molécula inhibidora. Por ejemplo, el agente puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC clase II, Gal9 , adenosina, TGFR beta, o CTLA4 (por ejemplo, ipilimumab (también referido como MDX-010 y MDX-101, y comercializado como Yervoy®; Bristol-Myers Squibb; tremelimumab (anticuerpo monoclonal IgG2 disponible de Pfizer, anteriormente conocido como ticilimumab, CP-675206).). En un ejemplo, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a TIM3. En un ejemplo, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a LAG3. En los ejemplos, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR, por ejemplo, inhibidor de una molécula inhibidora, se administra en combinación con un CAR alogénico, por ejemplo, un CAR alogénico descrito en el presente

documento (por ejemplo, descrito en la sección de CAR alogénico en el presente documento).

[0643] PD-1 es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28, que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS, y BTLA. PD-1 se expresa en células B, células T y células mieloides activadas (Agata et al 1996 Int Immunol. 8: 765-75). Dos ligandos para PD-1, PD-L1 y PD-L2, han demostrado regular por disminución la activación de células T tras la unión a PD-1 (Freeman et un 2000 J Exp Med 192: 1027-1034; Latchman et al 2001 Nat Immunol. 2: 261-8; Carter et al 2002 Eur J Immunol 32: 634-43). PD-L1 es abundante en cánceres humanos (Dong et al 2003 J Mol Med 81: 281-7; Blank et al 2005 Cancer Immunol Immunother 54: 307-314; Konishi et al 2004 Clin Cancer Res. 10: 5094) . La supresión inmunitaria se puede invertir mediante la inhibición de la interacción local de PD-1 con PD-L1. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y otros inhibidores de PD-1, PD-L1 y PD-L2 están disponibles en la técnica y se pueden utilizar en combinación con un CAR de la presente invención descrito en el presente documento. Por ejemplo, nivolumab (también referido como BMS-936558 o MDX1106; Bristol-Myers Squibb) es un anticuerpo monoclonal IgG4 totalmente humano que bloquea específicamente PD-1. Nivolumab (clon 5C4) y otros anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a PD-1 se describen en US 8.008.449 y WO2006/121168. Pidilizumab (CT-011; Cure Tech) es un anticuerpo monoclonal IgGlk humanizado que se une a PD-1. Pidilizumab y otros anticuerpos monoclonales anti-PD-1 humanizados se describen en WO2009/101611. Lambrolizumab (también referido como MK03475; Merck) es un anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado que se une a PD-1. Lambrolizumab y otros anticuerpos anti-PD-1 humanizados se describen en US 8.354.509 y WO2009/114335. MEDI4736 (Medimmune) es un anticuerpo monoclonal humano que se une a PDL1 e inhibe la interacción del ligando con PD1. MDPL3280A (Genentech/Roche) es un anticuerpo monoclonal IgG1 optimizado con Fc humano que se une a PD-L1. MDPL3280A y otros anticuerpos monoclonales humanos para PD-L1 se describen en la Patente de Estados Unidos No.: 7.943.743 y la Publicación de Estados Unidos No.: 20120039906. Otros agentes de unión anti-PD-L1 incluyen YW243.55.S70 (se muestran las regiones variables de cadena pesada y ligera en las SEQ ID NOs 20 y 21 en WO2010/077634) y MDX-1 105 (también conocido como BMS-936559, y, por ejemplo, agentes de unión anti-PD-Ll descritos en el documento WO2007/005874). AMP-224 (B7-DCIG; Amplimmune; por ejemplo, que se describe en WO2010/027827 y WO2011/066342), es un receptor soluble de fusión Fc PD-L2 Fc que bloquea la interacción entre PD-1 y B7-H1. Otros anticuerpos anti-PD-1 incluyen AMP 514 (Amplimmune), entre otros, por ejemplo, anticuerpos anti-PD-1 descritos en US 8609089, US 2010028330, y/o US 20120114649.

[0644] TIM3 (inmunoglobulina-3 de células T) también regula negativamente la función de las células T, particularmente en células T auxiliares 1 CD4+ y citotóxicas CD8+ 1 que secretan IFN-g y juega un papel crítico en el agotamiento de células T. La inhibición de la interacción entre TIM3 y sus ligandos, por ejemplo, galectina-9 (Gal9), fosfatidilserina (PS), y HMGB1, puede aumentar la respuesta inmunitaria. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y otros inhibidores de TIM3 y sus ligandos están disponibles en la técnica y pueden ser utilizados en combinación con un CAR CD19 descrito en el presente documento. Por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, moléculas pequeñas, o inhibidores de péptido que reconocen TIM3 se unen al dominio IgV de TIM3 para inhibir la interacción con sus ligandos. Los anticuerpos y péptidos que inhiben TIM3 se describen en WO2013/006490 y US20100247521. Otros anticuerpos anti-TIM3 incluyen versiones humanizadas de RMT3-23 (descritas en Ngiow et al, 2011, Cancer Res., 71: 3540-3551), y el clon 8B.2C12 (descrito en Monney et al, 2002, Nature, 415: 536-541). Los anticuerpos biespecíficos que inhiben TIM3 y PD-1 se describen en US20130156774.

[0645] En otros casos, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR es un inhibidor de CEACAM (por ejemplo, un inhibidor de CEACAM-1, CEACAM-3, y/o CEACAM-5). En un ejemplo, el inhibidor de CEACAM es una molécula de anticuerpo anti-CEACAM. Los ejemplos de anticuerpos anti-CEACAM-1 se describen en los documentos WO 2010/125571, WO 2013/082366 WO 2014/059251 y WO 2014/022332, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal 34B1, 26H7, y 5F4; o una forma recombinante de los mismos, tal como se describe en, por ejemplo, US 2004/0047858, US 7.132.255 y WO 99/052552. En otros casos, el anticuerpo anti-CEACAM se une a CEACAM-5, tal como se describe en, por ejemplo, Zheng et al. PloS One 2010 Sep 2; 5 (9). pii: e12529 (DOI: 10: 1371/journal.pone.0021146), o reacciona cruzadamente con CEACAM-1 y CEACAM-5, tal como se describe en, por ejemplo, WO 2013/054331 y US 2014/0271618.

[0646] Sin desear estar ligado por la teoría, las moléculas de adhesión celular de antígeno carcinoembrionario (CEACAM), tales como CEACAM-1 y CEACAM-5, se cree que median, al menos en parte, en la inhibición de una respuesta inmunitaria antitumoral (Véase por ejemplo, Markel et al J Immunol 2002 Mar 15; 168 (6): 2803-10; Markel et al J Immunol 2006 Nov 1; 177 (9): 6062-71; Markel et al Immunology 2009 febrero ; 126 (2): 186-200; Markel et al Cancer Immunol Immunother 2010 Feb; 59 (2): 215-30; Ortenberg et al Mol Cancer Ther 2012 Jun; 11 (6): 1300-1310; Stern et al J Immunol 2005 Jun 1; 174 (11): 6692-701; Zheng et al PLoS One 2010 Sep 2; 5 (9) pii:. e12529). Por ejemplo, se ha descrito CEACAM-1 como un ligando heterofílico para TIM-3 y que juega un papel en la tolerancia y el agotamiento de células T mediada por TIM-3 (véase, por ejemplo, el documento WO 2014/022332; Huang, et al (2014) Nature doi: 10.1038/nature13848). En casos, se ha desmotrado que el co-bloqueo de CEACAM-1 y TIM-3 mejora una respuesta inmunitaria anti-tumoral en modelos de cáncer colorrectal con xenoinjerto (véase, por ejemplo, el documento WO 2014/022332; Huang, et al (2014), supra). En otros casos, el co-bloqueo de CEACAM-1 y PD-1 reduce la tolerancia de células T, tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2014/059251. Por lo tanto, los inhibidores de CEACAM se pueden utilizar con los otros inmunomoduladores descritos en el presente documento (por ejemplo, inhibidores anti-PD-1 y/o anti TIM-3) para potenciar una respuesta

inmunitaria contra un cáncer, por ejemplo, un melanoma, un cáncer de pulmón (por ejemplo, NSCLC), un cáncer de vejiga, un cáncer de colon, un cáncer de ovario, y otros tipos de cáncer, tal como se describen en el presente documento.

[0647] LAG3 (gen-3 de activación de linfocitos o CD223) es una molécula de superficie celular expresada en células T activadas y células B que se ha demostrado que desempeñan un papel en el agotamiento de las células T CD8+. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y otros inhibidores de LAG3 y sus ligandos están disponibles en la técnica y pueden ser utilizados en combinación con un CAR CD19 descrito en el presente documento. Por ejemplo, BMS-986016 (Bristol-Myers Squib) es un anticuerpo monoclonal que reconoce LAG3. IMP701 (Immutep) es un anticuerpo de LAG3 antagonista y IMP731 (Immutep y GlaxoSmithKline) es un anticuerpo de LAG3 de agotamiento. Otros inhibidores de LAG3 incluyen IMP321 (Immutep), que es una proteína de fusión recombinante de una porción soluble de LAG3 e Ig que se une a moléculas de MHC de clase II y activa células presentadoras de antígeno (APC). Otros anticuerpos se describen, por ejemplo, en WO2010/019570.

[0648] En algunos casos, el agente que aumenta la actividad de células T CD4+ que expresan CAR y/o células T CD8+ que expresan CAR, por ejemplo, una proteína de fusión que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en el que el primer dominio es una molécula inhibidora, o fragmento de la misma, y el segundo dominio es un polipéptido que se asocia con una señal positiva, por ejemplo, un polipéptido comprende un dominio de señalización antracellular, tal como se describe en el presente documento. En algunos casos, el polipéptido que se asocia con una señal positiva puede incluir un dominio coestimulador de CD28, CD27, ICOS, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular de CD28, CD27 y/o ICOS, y/o un dominio de señalización primaria, por ejemplo, de CD3 zeta, por ejemplo, descrito en el presente documento. En una realización, la proteína de fusión se expresa por la misma célula que expresa el CAR. En otro caso, la proteína de fusión se expresa por una célula, por ejemplo, una célula T que no expresa un CAR de la presente descripción.

[0649] En un ejemplo, el agente que mejora la actividad de células T CD4+ y células T CD8+ que expresan CAR descritas en el presente documento es miR-17-92.

[0650] En un ejemplo, el agente que mejora la actividad de las células CARX descritas en el presente documento es una citocina. Las citocinas tienen importantes funciones relacionadas con la expansión, la diferenciación, la supervivencia y la homeostasis de células T. Las citocinas que se pueden administrar al sujeto que reciben células CARX descritas en el presente documento incluyen: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-18 e IL-21, o una combinación de las mismas. En casos preferidos, la citocina administrada es IL-7, IL-15 o IL-21, o una combinación de las mismas. La citocina puede ser administrada una vez al día o más de una vez al día, por ejemplo, dos veces al día, tres veces al día, o cuatro veces al día. La citocina puede administrarse durante más de un día, por ejemplo, la citocina se administra durante 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, o 4 semanas. Por ejemplo, la citocina se administra una vez al día durante 7 días.

[0651] En los ejemplos, la citocina se administra en combinación con células que expresan CAR. La citocina puede administrarse simultáneamente o de forma concurrente con las células que expresan CAR, por ejemplo, administrarse en el mismo día. La citocina puede prepararse en la misma composición farmacéutica que las células que expresan CAR, o se pueden preparar en una composición farmacéutica separada. Alternativamente, la citocina puede administrarse poco después de la administración de las células que expresan CAR, por ejemplo, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días después de la administración de las células que expresan CAR. En los ejemplos en que se administra la citocina en un régimen de dosificación que tiene lugar durante más de un día, el primer día del régimen de dosificación de citocina puede ser en el mismo día que la administración con las células que expresan CAR, o el primer día del régimen de dosificación de citocinas puede ser de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, o 7 días después de la administración de las células que expresan CAR. En un ejemplo, en el primer día, las células que expresan CAR se administran al sujeto, y en el segundo día, una citocina se administra una vez al día durante los siguientes 7 días. En un ejemplo preferido, la citocina que se administra en combinación con las células que expresan CAR es IL-7, IL-15 o IL-21, o una combinación de los mismos.

[0652] En otros casos, la citocina se administra un período de tiempo suficiente después de la administración de las células que expresan CAR, por ejemplo, al menos 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas, 12 semanas, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 1 año o más después de la administración de las células que expresan CAR. En un ejemplo, la citocina se administra después de la evaluación de la respuesta del sujeto a las células que expresan CAR. Por ejemplo, las células que expresan CAR se administran al sujeto de acuerdo con la dosis y regímenes descritos en el presente documento. La respuesta del sujeto a la terapia con CART se evaluó a las 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas, 12 semanas, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, o 1 año o más después de la administración de las células que expresan CAR, utilizando cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, incluyendo la inhibición del crecimiento del tumor, la reducción de las células tumorales circulantes, o regresión del tumor. Los sujetos que no muestran una respuesta suficiente a la terapia con CART se pueden administrar con una citocina. La administración de la citocina al sujeto que tiene una respuesta sub-óptima a la terapia con CART mejora la eficacia de CART o actividad antitumoral. En un ejemplo, la citocina que se administra después de la administración de las células que expresan CAR es IL-7.

COMBINACIÓN CON UNA DOSIS BAJA QUE AUMENTA LA INMUNIDAD INHIBIDOR DE MTOR

[0653] Las células T CD4+ que expresan un CAR^{CD4+} y/o células T CD8+ que expresan un CAR^{CD8+} descritas en el presente documento, se pueden administrar en combinación con una dosis baja que aumentan la inmunidad de un inhibidor de mTOR. Los procedimientos descritos en el presente documento utilizan dosis bajas que aumentan la inmunidad de inhibidores de mTOR, por ejemplo, inhibidores de mTOR alostéricos, incluyendo rapálogos, tales como RAD001. La administración de una dosis baja, que aumenta la inmunidad, de un inhibidor de mTOR (por ejemplo, una dosis que es suficiente para suprimir completamente el sistema inmunitario, pero suficiente para mejorar la función inmunitaria) puede optimizar el rendimiento de las células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T o células que expresan CAR, en el sujeto. Los procedimientos para medir la inhibición de mTOR, las dosis, regímenes de tratamiento, y composiciones farmacéuticas adecuadas se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 2015/01240036.

[0654] En un ejemplo, la administración de una dosis baja que aumenta la inmunidad de un inhibidor de mTOR puede dar lugar a uno o más de los siguientes:
i) una disminución en el número de células efectoras inmunes positivas de PD-1;
ii) un aumento en el número de células efectoras inmunes negativas de PD-1;
iii) un aumento en la proporción de células efectoras inmunes negativas de PD-1/células efectoras positivas de PD-1;
iv) un aumento en el número de células T sin tratar;
v) un aumento en la expresión de uno o más de los siguientes marcadores: $CD62L^{alto}$, $CD127^{alto}$, CD27+, y BCL2, por ejemplo, en las células T de memoria, por ejemplo, precursores de células T de memoria;
vi) una disminución en la expresión de KLRG1, por ejemplo, en las células T de memoria, por ejemplo, precursores de células T de memoria; o
vii) un aumento en el número de precursores de células T de memoria, por ejemplo, células con uno cualquiera o una combinación de las siguientes características: aumento de $CD62L^{alto}$, aumento de $CD127^{alto}$, aumento de CD27+, disminución de KLRG1 y aumento de BCL2;
y en la que cualquiera de ii), iii), iv), v), vi), o vii), se produce, por ejemplo, i), por ejemplo, al menos transitoriamente, por ejemplo, en comparación con un sujeto no tratado.

[0655] En otro ejemplo, la administración de una dosis baja, que aumenta la inmunidad, de un inhibidor de mTOR da lugar a una proliferación o persistencia aumentada o prolongada de células que expresan CAR, por ejemplo, en cultivo o en un sujeto, por ejemplo, en comparación con células que expresan CAR no tratadas o un sujeto no tratado. En ejemplos, el aumento de la proliferación o la persistencia está asociado con un aumento en el número de células que expresan CAR. Los procedimientos para medir una proliferación aumentada o prolongada se describen en los Ejemplos 8 y 9. En otro ejemplo, la administración de una dosis baja, que aumenta la inmunidad, de un inhibidor de mTOR da lugar a un aumento de la muerte de las células cancerosas por las células que expresan CAR, por ejemplo, en cultivo o en un sujeto, por ejemplo, en comparación con células que expresan CAR no tratadas o un sujeto no tratado. En casos, el aumento de la muerte de las células cancerosas se asocia con una disminución en el volumen tumoral. Los procedimientos para medir el aumento de la destrucción de células cancerosas se describen en el Ejemplo 6.

[0656] En un caso, las células que expresan una molécula de CAR, por ejemplo, una molécula de CAR descrita en el presente documento, se administran en combinación con una dosis baja, que aumenta la inmunidad, de un inhibidor de mTOR, por ejemplo, un inhibidor de mTOR alostérico, por ejemplo, RAD001, o un inhibidor de mTOR catalítico. Por ejemplo, la administración de la dosis baja, que aumenta la inmunidad, del inhibidor de mTOR puede iniciarse antes de la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento; puede completarse antes de la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento; puede iniciarse al mismo tiempo que la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento; puede solaparse con la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento; o puede continuar después de la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento.

[0657] Alternativamente, o además, la administración de una dosis baja que aumenta la inmunidad de un inhibidor de mTOR puede optimizar células efectoras inmunitarias a modificar para expresar una molécula de CAR descrita en el presente documento. En tales casos, la administración de una dosis baja queaumenta la inmunidad de un inhibidor de mTOR, por ejemplo, un inhibidor alostérico, por ejemplo, RAD001, o un inhibidor catalítico, es iniciada o completada antes de la recogida de células efectoras inmunitarias, por ejemplo, las células T o células NK, a modificar para expresar una molécula de CAR descrita en el presente documento, de un sujeto.

[0658] En otro ejemplo, las células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T o células NK, para modificar genéticamente para expresar una molécula de CAR descrita en el presente documento, por ejemplo, después de la recogida de un sujeto o células efectoras inmunitarias que expresa CAR, por ejemplo, células T o células NK, por ejemplo, antes de la administración a un sujeto, pueden cultivarse en presencia de una dosis baja, que aumenta la inmunidad de un inhibidor de mTOR.

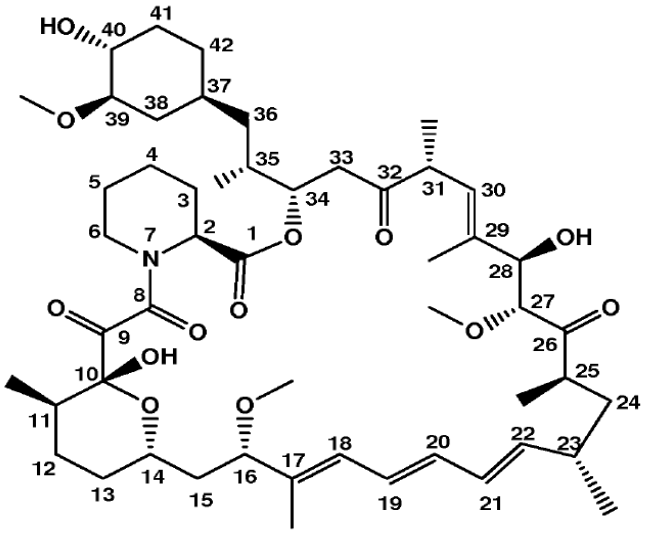
[0659] En un ejemplo, administración al sujeto de una dosis baja, que aumenta la inmunidad, de un inhibidor de mTOR comprende administrar, por ejemplo, una vez por semana, por ejemplo, en una forma de dosificación de liberación inmediata, de 0,1 a 20, 0,5 a 10, 2,5 a 7,5, 3 a 6, o aproximadamente 5, mg de RAD001, o una dosis bioequivalente de la misma. En un ejemplo, la administración al sujeto de una dosis baja, que aumenta la inmunidad, de un inhibidor de mTOR comprende administrar, por ejemplo, una vez por semana, por ejemplo, en una forma de dosificación de liberación sostenida, de 0,3 a 60, 1,5 a 30, 7,5 a 22,5, 9 a 18, o aproximadamente 15 mg de RAD001, o una dosis bioequivalentes de la misma.

[0660] En un ejemplo, una dosis de un inhibidor de mTOR se asocia con, o proporciona, la inhibición de mTOR de al menos 5 pero no más de 90%, al menos 10, pero no más de 90%, al menos 15, pero no más de un 90%, al menos 20, pero no más de 90%, al menos 30, pero no más de 90%, al menos 40, pero no más de 90%, al menos 50, pero no más de 90%, al menos 60, pero no más de un 90%, al menos 70, pero no más de 90%, al menos 5 pero no más de 80%, al menos 10, pero no más de 80%, al menos 15, pero no más de 80%, al menos 20, pero no más de 80%, al menos 30, pero no más de 80%, al menos 40, pero no más de 80%, al menos 50, pero no más de 80%, al menos 60, pero no más de 80%, al menos 5, pero no más de 70%, al menos 10, pero no más de 70%, al menos 15, pero no más de 70%, al menos 20, pero no más de 70%, al menos 30, pero no más de 70%, al menos 40, pero no más de 70%, al menos 50, pero no más de 70%, al menos 5 pero no más de 60%, al menos 10, pero no más de 60%, al menos 15, b ut no más de 60%, al menos 20, pero no más de 60%, al menos 30, pero no más de 60%, al menos 40, pero no más de 60%, al menos 5 pero no más de 50%, al menos 10 pero no más de 50%, al menos 15, pero no más de 50%, al menos 20, pero no más de 50%, al menos 30, pero no más de 50%, al menos 40, pero no más de 50%, al menos 5 pero no más de 40%, al menos 10, pero no más de 40%, al menos 15, pero no más de 40%, al menos 20, pero no más de 40%, al menos 30, pero no más de 40%, al menos 35 pero no más de 40%, al menos 5 pero no más de 30%, al menos 10, pero no más de 30%, al menos 15, pero no más de 30%, al menos 20, pero no más de 30%, o al menos 25, pero no más de 30%.

[0661] El grado de inhibición de mTOR se puede expresar como, o corresponde a, el grado de inihbición de quinasa p70 S6, por ejemplo, el grado de inhibición de mTOR puede determinarse por el nivel de disminución de la actividad de quinasa p70 S6, por ejemplo, por la disminución de la fosforilación de un sutrato de quinasa P70 S6. El nivel de inhibición de mTOR puede ser evaluado mediante diversos procedimientos, tal como la medición de la actividad de quinasa P70 S6 mediante el ensayo de Boulay, tal como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 2015/01240036, o tal como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 7.727.950; la medición del nivel de S6 fosforilado mediante transferencia Western; o la evaluación de un cambio en la relación de células efectoras inmunitarias negativas de PD1 con respecto a las células efectoras inmunitarias positivas de PD1.

[0662] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "inhibidor de mTOR" se refiere a un compuesto o ligando, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que inhibe la mTOR quinasa en una célula. En un ejemplo, un inhibidor de mTOR es un inhibidor alostérico. Los inhibidores alostéricos de mTOR incluyen el compuesto neutro tricíclico rapamicina (sirolimus), compuestos relacionados con rapamicina, es decir compuestos que tienen similitud estructural y funcional con la rapamicina incluyendo, por ejemplo, derivados de rapamicina, análogos de rapamicina (también denominados como rapálogos) y otros compuestos macrólidos que inhiben la actividad de mTOR. En un ejemplo, un inhibidor de mTOR es un inhibidor catalítico.

[0663] La rapamicina es un conocido antibiótico macrólido producido por Streptomyces hygroscopicus que tiene la estructura mostrada en la Fórmula A.



(A)

[0664] Véase, por ejemplo, McAlpine, JB, et al, J. Antibiotics (1991) 44: 688; Schreiber, SL, et al., J. Am. Chem. Soc. (1991) 113: 7433; patente de Estados Unidos No. 3.929.992. Hay varios esquemas de numeración propuestos para la rapamicina. Para evitar confusiones, cuando se mencionan análogos de rapamicina específicos en el presente documento, los nombres se proporcionan con referencia a la rapamicina utilizando el esquema de numeración de la fórmula A.

[0665] Los análogos de rapamicina útiles en la invención son, por ejemplo, análogos O-sustituidos en los que el grupo hidroxilo en el anillo ciclohexilo de rapamicina está reemplazado por OR_1 en el que R_1 es hidroxialquilo, hidroxialcoxialquilo, acilaminoalquilo, o aminoalquilo; por ejemplo RAD001, también conocido como everolimus, tal como se describe en los documentos US 5.665.772 y WO94/09010.

[0666] Otros análogos de rapamicina adecuados incluyen aquellos sustituidos en la posición 26 o 28. El análogo de rapamicina puede ser un epímero de un análogo mencionado anteriormente, en particular un epímero de un análogo sustituido en la posición 40, 28 o 26, y puede estar opcionalmente hidrogenado adicionalmente, por ejemplo, tal como se describe en los documentos US 6.015.815, WO95/14023 y WO99/15530, por ejemplo ABT578, también conocidos como zotarolimus o un análogo de rapamicina descrito en US 7.091.213, WO98/02441 y WO01/14387, por ejemplo AP23573 también conocido como ridaforolimus.

[0667] Los ejemplos de análogos de rapamicina adecuados para su uso en la presente invención de US 5.665.772 incluyen, pero no se limitan a, 40-O-bencil-rapamicina, 40-O-(4'-hidroximetil)bencil-rapamicina, 40-O-[4'-(1,2-dihidroxietil)]bencil-rapamicina, 40-0-alil-rapamicina, 40-O-[3'-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4(S)-il)-prop-2'-en-1'-il]-rapamicina, (2'E, 4'S)-40-O-(4',5'-dihidroxipent-2'-en-1'-il)-rapamicina, 40-0-(2-hidroxi)etoxicarbonilmetil-rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, 40-0-(3-hidroxi)propil-rapamicina, 40-O-(6-hidroxi)hexil-rapamicina, 40-O-[2-(2-hidroxi)etoxi] etil-rapamicina, 40-O-[(3S)-2,2-dimetildioxolan-3-il] metil-rapamicina, 40-O-[(2S)-2,3-dihidroxiprop-1-il]-rapamicina, 40-O-(2-acetoxi)etil-rapamicina, 40-0-(2-nicotinoiloxi)etil-rapamicina, 40-O-[2-(N-morfolino)acetoxi] etil-rapamicina, 40-O-(2-N-imidazolilacetoxi) etil-rapamicina, 40-O-[2-(N-metil-N'-piperazinil)acetoxi]etil-rapamicina, 39-O-desmetil-39,40-O,O-etilen-rapamicina, (26R)-26-dihidro-40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, 40-O-(2-aminoetil)-rapamicina, 40-O-(2-acetaminoetil)-rapamicina, 40-O-(2-nicotinamidoetil) rapamicina, 40-O-(2-(N-metil-imidazo-2'-ilcarbetoxamido)etil)-rapamicina, 40-O-(2-etoxicarbonilaminoetil)-rapamicina, 40-0-(2-tolilsulfonamidoetil)-rapamicina y 40-O- [2-(4',5'- dicarboetoxi-1', 2', 3'-triazol-1'-il)-etil]-rapamicina.

[**0668**] Otros análogos de rapamicina útiles en la presente invención son análogos donde el grupo hidroxilo en el anillo ciclohexilo de rapamicina y/o el grupo hidroxilo en la posición 28 se sustituye con un grupo hidroxiéster, por ejemplo, análogos de rapamicina que se encuentran en US RE44,768, por ejemplo, temsirolimus.

[0669] Otros análogos de rapamicina útiles en la presente invención incluyen aquellos en los que el grupo metoxi en la posición 16 se sustituye por otro sustituyente, preferiblemente alquiniloxi (opcionalmente sustituido con hidroxi), bencilo, ortometoxi bencilo o clorobencilo y/o en donde el grupo metoxi en la posición 39 se elimina junto con el carbono 39 de modo que el anillo de ciclohexilo de la rapamicina se convierte en un anillo de ciclopentilo que carece del grupo metioxi en la posición 39; por ejemplo, tal como se describe en los documentos WO95/16691 y WO96/41807. Los análogos pueden modificarse adicionalmente de tal manera que el hidroxi en la posición 40 de la rapamicina está alquilado y/o el carbonilo 32 se reduce.

[0670] Los análogos de rapamicina de WO95/16691 incluyen, pero no se limitan a, 16-desmetoxi-16-(pent-2-inil)oxi-rapamicina, 16-desmetoxi-16-(but-2-inil)oxi-rapamicina, 16-desmetoxi-16-(propargil)oxi-rapamicina, 16-desmetoxi-16-(4-hidroxi-but-2-inil) oxi-rapamicina, 16-desmetoxi-16-benciloxi-40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina, 16-desmetoxi-16-benciloxi-rapamicina, 16-desmetoxi-16-orto-metoxibencil-rapamicina, 16-desmetoxi-40-O-(2-metoxietil)-16-pent-2-inil)oxi-rapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-formil-42-norrapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-hidroximetil-42-norrapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-carboxi-42 nor-rapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-(4-metil-piperazin-1-il)carbonil-42-nor-rapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-(morfolin-4-il)carbonil-42-nor-rapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-[N-metil, N-(2-piridin-2-il-etil)] carbamoil-42-norrapamicina y 39-desmetoxi-40- desoxi-39-(p-toluenesulfonilhidrazonometil)-42-norrapamicina.

[0671] Los análogos de rapamicina de WO96/41807 incluyen, pero no se limitan a, 32-desoxorapamicina, 16-O pent-2-inil-32-desoxorrapamicina, 16-O-pent-2-inil-32-desoxo-40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina, 16-O-pent-2-inil-32-(S) dihidro-40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina, 32(S)-dihidro-40-O-(2-metoxi)etil-rapamicina y 32-(S)-dihidro-40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina.

[**0672**] Otro análogo de rapamicina adecuado es umirolimus, tal como se describe en US2005/0101624.

[0673] RAD001, también conocido como everolimus (Afinitor®), tiene el nombre químico (1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28E, 30S, 32S, 35R)-1,18-dihidroxi-12-{(1R)-2 - [(1S, 3R, 4R)-4-(2-hidroxietoxi)-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-11,36-dioxa-4-aza-triciclo [30.3.1.04,9] hexatriaconta-16,24,26,28-tetraeno-2,3,10,14,20-pentaona, tal como se describe en los documentos US 5.665.772 y WO94/09010.

[0674] Otros ejemplos de inhibidores de mTOR alostéricos incluyen sirolimus (rapamicina, AY-22989), 40-[3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropanoato] -rapamicina (también llamado temsirolimus o CCI-779) y ridaforolimus (AP-23573/MK-8669). Otros ejemplos de inhibtors de mTor alostéricos incluyen zotarolimus (ABT578) y umirolimus.

[0675] Alternativamente o adicionalmente, se han encontrado inhibidores de mTOR catalíticos, competitivos con ATP, que reconocen el dominio quinasa de mTOR directamente y reconocen tanto mTORC1 como mTORC2. Estos también son inhibidores más eficaces de mTORC1 que dichos inhibidores de mTOR alostéricos, tales como rapamicina, porque modulan las acciones de mTORC1 resistente a rapamicina, tales como la fosforilación de 4EBP1-T37/46 y la traducción dependiente de bloqueador.

[0676] Los inhibidores catalíticos incluyen: BEZ235 o 2-metil-2-[4-(3-metil-2-oxo-8-quinolin-3-il-2,3-dihidro-imidazo [4,5-c] quinolin-1-il)-fenil]propionitrilo, o la forma de sal monotosilato (la síntesis de BEZ235 se describe en el documento WO2006/122806); CCG168 (de otro modo conocido como AZD-8055, Chresta, CM, et al, Cancer Res, 2010, 70 (1), 288-298), que tiene el nombre químico {5-[2,4-bis-((S)-3-metil-morfolin-4-il)pirido [2,3d] pirimidin-7-il]-2-metoxifenil}-metanol; 3-[2,4-bis[(3S)-3-metilmorfolin-4-il]pirido [2,3-d]pirimidin-7-il]-N-metilbenzamida (WO09104019); 3-(2-aminobenzo[d]oxazol-5-il)-1-isopropil-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4-amina (WO10051043 y WO2013023184); A N-(3-(N-(3-((3,5-dimetoxifenil)amino)quinoxalina-2-il) sulfamoil) fenil)-3-metoxi-4-metilbenzamida (WO07044729 y WO12006552); PKI-587 (Venkatesan, AM, J. Med.Chem., 2010, 53, 2636-2645), que tiene el nombre químico 1-[4-[4-(dimetilamino)piperidin-1-carbonil]fenil]-3-[4-(4,6-dimorfolino-1,3,5-triazin-2-il)fenil] urea; GSK-2126458 (ACS Med. Chem. Lett., 2010, 1, 39-43), que tiene el nombre químico 2,4-difluoro-N-{2-metoxi-5-[4-(4-piridazinilo)-6-quinolinil]-3-piridinil}bencenosulfonamida; 5-(9-isopropil-8-metil-2-morfolino-9H-purin-6-il) pirimidin-2-amina (WO10114484); y (E)-N-(8-(6-amino-5-(trifluorometil) piridin-3-il)-1-(6-(2-cianopropan-2-il) piridin-3-il)-3- metil-1H-imidazo [4,5-c] quinolin-2 (3H)-iliden) cianamida (WO12007926).

[0677] Otros ejemplos de inhibidores de mTOR catalíticos incluyen 8-(6-metoxi-piridin-3-il)-3-metil-1-(4-piperazin-1-il-3-trifluorometil-fenil)-1,3- dihidro-imidazo [4,5-c] quinolin-2-ona (WO2006/122806) y Ku-0063794 (García-Martínez JM, et al., Biochem J., 2009, 421 (1), 29-42. Ku-0063794 es un inhibidor específico de la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR).) WYE-354 es otro ejemplo de un inhibidor de mTOR catalítico (Yu K, et al. (2009). Biochemical Cellular, and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin Res Cancer 69 (15): 6232-6240).

[0678] Los inhibidores de mTOR útiles según la presente invención también incluyen profármacos, derivados, sales farmacéuticamente aceptables, o sus análogos de cualquiera de los anteriores. Los inhibidores de mTOR, tales como RAD001, pueden formularse para el suministro basado en procedimientos bien establecidos en la técnica basándose en las dosificaciones particulares descritas en el presente documento. En particular, la Patente de Estados Unidos Nº 6.004.973 proporciona ejemplos de formulaciones utilizables con los inhibidores de mTOR descritos en el presente documento.

PROCEDIMIENTOS Y BIOMARCADORES PARA EVALUAR LA EFICACIA DE CAR O CONVENIENCIA DE LA MUESTRA

[0679] En otro aspecto, la presente descripción presenta un procedimiento para evaluar o controlar la eficacia de una terapia con células que expresan CAR, en un sujeto (por ejemplo, un sujeto que tiene un cáncer), o la idoneidad de una muestra (por ejemplo, una muestra de aféresis) para una terapia con CAR, por ejemplo, incluyendo la terapia la administración de una dosis baja, que mejora la inmunidad, de un inhibidor de mTOR. El procedimiento incluye la adquisición de un valor de efectividad para la terapia con CAR, o la idoneidad de la muestra, en el que dicho valor es indicativo de la eficacia o idoneidad de la terapia con células que expresan CAR.

[0680] En los ejemplos, el valor de eficacia a la terapia con CAR, o la idoneidad de la muestra, comprende una medición de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más (todos) de los siguientes:
(i) el nivel o la actividad de una, dos, tres, o más (por ejemplo, todas) de células T_{EEF} en resposo, células T_{REG} en reposo, células T más jóvenes (por ejemplo, células CD4 o CD8, o células T gamma/delta), o células T de memoria temprana, o una combinación de las mismas, en una muestra (por ejemplo, una muestra de aféresis o una muestra de producto celular que expresa CAR fabricado);
(ii) el nivel o la actividad de una, dos, tres, o más (por ejemplo, todas) de células T_{EEF} activadas, células T_{REG} activadas, células T más viejas (por ejemplo, células CD4 o CD8 más viejas), o células T de memoria tardía, o una combinación de las mismas, en una muestra (por ejemplo, una muestra de aféresis o una muestra de producto celular que expresa CAR fabricado);
(iii) el nivel o actividad de un marcador de agotamiento de células inmunitarias, por ejemplo, uno, dos o más inhibidores de puntos de control inmunitarios (por ejemplo, PD-1, PD-L1, TIM-3 y/o LAG-3) en una muestra (por ejemplo, una muestra de aféresis o una muestra de producto celular que expresa CAR fabricado). En un ejemplo, una célula inmunitaria tiene un fenotipo agotado, por ejemplo, co-expresa al menos dos marcadores de agotamiento, por ejemplo, co-expresa PD-1 y TIM-3. En otros casos, una célula inmunitaria tiene un fenotipo agotado, por ejemplo, co-expresa al menos dos marcadores de agotamiento, por ejemplo, co-expresa PD-1 y LAG-3;
(iv) el nivel o la actividad de células efectoras inmunitarias de CD27 y/o CD45RO (por ejemplo, CD27+ CD45RO-),

por ejemplo, en una población de células T CD4+ o CD8+, en una muestra (por ejemplo, una muestra de aféresis o una muestra de producto celular que expresa CAR fabricado);
(v) el nivel o la actividad de uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez, doce o más de los biomarcadores seleccionados de entre CCL20, IL-17A y/o IL-6, PD-1, PD-L1, LAG- 3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1;
(vi) un nivel o actividad de la citocina (por ejemplo, la calidad de repertorio de citocina) en una muestra de producto celular que expresa CAR; o
(vii) una eficiencia de transducción de una célula que expresa CAR en una muestra de producto celular que expresa un CAR fabricado.

[0681] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la terapia con células que expresan CAR comprende una pluralidad (por ejemplo, una población) de células efectoras inmunitarias que expresan CAR, por ejemplo, una pluralidad (por ejemplo, una población) de células T o células NK, o una combinación de las mismas. En un ejemplo, la terapia con células que expresan CAR incluye la administración de una dosis baja que mejora la inmunidad de un inhibidor de mTOR.

[0682] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la medida de uno o más de (i)-(vii) se obtiene de una muestra de aféresis adquirida del sujeto. La muestra de aféresis puede ser evaluada antes de la infusión o reinfusión.

[0683] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la medida de uno o más de (i)-(vii) se obtiene de una muestra de producto de células que expresan CAR manufacturado. El producto de células que expresan CAR manufacturado se puede evaluar antes de la infusión o reinfusión.

[0684] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el sujeto se evalúa antes de recibir, durante o después de recibir, la terapia de células que expresan CAR.

[0685] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la medida de uno o más de (i)-(vii) evalúa un perfil para una o más de la expresión génica, citometría de flujo o expresión de la proteína.

[0686] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el procedimiento comprende además la identificación del sujeto como un respondedor, un no respondedor, con recaída o sin recaída, basado en una medida de uno o más de (i)-(vii).

[0687] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, un respondedor (por ejemplo, un respondedor completo) tiene, o se identifica como que tiene, un nivel mayor o actividad de uno, dos, o más (todos) de GZMK, PPF1BP2 , o células T sin trtar en comparación con un no respondedor.

[0688] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, un no respondedor tiene, o se identifica como que tiene, un nivel mayor o actividad de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o más (por ejemplo, todos) de IL22, IL-2RA, IL-21, IRF8, IL8, CCL17, CCL22, células T efectoras o células T reguladoras, en comparación con un respondedor.

[0689] En un ejemplo, un paciente con recaída es un paciente que tiene, o que está identificado como que tiene, un mayor nivel de expresión de uno o más de (por ejemplo, 2, 3, 4, o todos) los siguientes genes, en comparación con un paciente sin recaída: MIR199A1, MIR1203, uc021ovp, ITM2C, y HLA-DQB1 y/o una disminución de los niveles de expresión de uno o más de (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 , o todos) los siguientes genes, en comparación con los pacientes sin recaída: PPIAL4D, TTTY10, TXLNG2P, MIR4650-1, KDM5D, USP9Y, PRKY, RPS4Y2, RPS4Y1, NCRNA00185, SULT1E1, y EIF1AY.

[0690] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, un respondedor completo tiene, o se identifica como que tiene, un mayor porcentaje, por ejemplo, un mayor porcentaje estadísticamente significativo, de células T CD8+ en comparación con un valor de referencia, por ejemplo, el porcentaje de células T CD8+ de un no respondedor.

[0691] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, un respondedor completo tiene, o se identifica como que tiene, un porcentaje mayor de células inmunes efectoras CD27+CD45RO-, por ejemplo, en la población CD8+, en comparación con un valor de referencia, por ejemplo, un número de las células inmunes efectoras CD27+CD45RO- de un no respondedor.

[0692] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, un respondedor completo o un respondedor parcial tiene o es identificado como que tiene, un mayor porcentaje, por ejemplo, un mayor porcentaje estadísticamente significativ, de células T CD4+ en comparación con un valor de referencia, por ejemplo, un porcentaje de las células T CD4+ de un no respondedor.

[0693] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, un respondedor

completo tiene, o se identifica como que tiene, un porcentaje mayor de una, dos, tres, o más (por ejemplo, todas) de células T_{EFF} en reposo, células T_{REG} en reposo, células T más jovenes (por ejemplo, células CD4 o CD8 más jóvenes, o células T gamma/delta), o células T de memoria temprana, o una combinación de las mismas, en comparación con un valor de referencia, por ejemplo, un número en un no respondedor de células T_{EFF} en reposo, células T_{REG} en reposo, células T más jovenes (por ejemplo, células CD4 o CD8 más jóvenes), o células T de memoria temprana.

[0694] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, un no respondedor tiene, o se identifica como que tiene, un porcentaje mayor de una, dos, tres, o más (por ejemplo, todas) las células T_{EFF} activadas, células T_{REG} activadas, células T más viejas (por ejemplo, células CD4 o CD8 más viejas), o células T de memoria tardía, o una combinación de las mismas, en comparación con un valor de referencia, por ejemplo, un número en respondedor de células T_{EFF} activadas, células T_{REG} activadas, células T más viejas (por ejemplo, células CD4 o CD8 más viejas), o células T de memoria tardía.

[0695] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, un no respondedor tiene, o se identifica como que tiene, un porcentaje mayor de un marcador de agotamiento de células inmunitarias, por ejemplo, uno, dos o más inhibidores de puntos de control inmunitario (por ejemplo, PD-1, PD-L1, TIM-3 y/o LAG-3). En un caso, un no respondedor tiene, o se identifica como que tiene, un porcentaje mayor de células efectoras inmunitarias que expresan PD-1, PD-L1, o LAG-3 (por ejemplo, células T CD4+ y/o células T CD8 +) (por ejemplo, células CD4+ y/o células T CD8+ que expresan CAR) en comparación con el porcentaje de células efectoras inmunitarias que expresan PD-1, PD-L1, o LAG-3 de un respondedor.

[0696] En un caso, un no respondedor tiene, o se identifica como que tiene, un porcentaje mayor de células inmunitarias que tienen un fenotipo agotado, por ejemplo, células inmunitarias que coexpresan al menos dos marcadores de agotamiento, por ejemplo, coexpresan PD-1, PD-L1 y/o TIM-3. En otros casos, un no respondedor tiene, o se identifica como que tiene, un porcentaje mayor de células inmunitarias que tienen un fenotipo agotado, por ejemplo, células inmunitarias que coexpresan al menos dos marcadores de agotamiento, por ejemplo, coexpresan PD-1 y LAG-3.

[0697] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, un no respondedor tiene, o se identifica como que tiene, un porcentaje mayor de células PD-1/PD-L1+/LAG-3+ en la población de células que expresan CAR en comparación con un respondedor (por ejemplo, un respondedor completo) a la terapia de células que expresan CAR.

[0698] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, un respondedor parcial tiene, o se identifica como que tiene, porcentajes más altos de células PD-1/PD-L1 +/LAG-3+, que un respondedor, en la población de células que expresan CAR.

[0699] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, un no respondedor tiene, o se identifica como que tiene, un fenotipo agotado de PD1/PD-L1+CAR+ y co-expresión de LAG3 en la población de células que expresan CAR.

[0700] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, un no respondedor tiene, o se identifica como que tiene, un porcentaje mayor de células PD-1/PD-L1+/TIM-3+ en la población de células que expresan CAR en comparación con el respondedor (por ejemplo, un respondedor completo).

[0701] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, una respuesta parcial tiene, o se identifica por tener, un mayor porcentaje de células PD-1/PD-L1+/TIM-3+, que los respondedores, en la población de células que expresan CAR.

[0702] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la presencia de células T CD8+ CD27+ CD45RO- en una muestra de aféresis es un predictor positivo de la respuesta de sujetos a una terapia con células que expresan CAR.

[0703] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presentedocumento, un alto porcentaje de células T PD1+CAR+ y LAG3+ o TIM3+ en una muestra de aféresis es un predictor de mal pronóstico de la respuesta de sujetos a una terapia de células que expresan CAR.

[0704] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el respondedor (por ejemplo, el respondedor completo o parcial) tiene uno, dos, tres o más (o todos) del siguiente perfil:
(i) tiene un número mayor de células efectoras inmunitarias CD27+ en comparación con un valor de referencia, por ejemplo, un número de células efectoras inmunitarias CD27+ de un no respondedor;
(ii) tiene un número mayor de células T CD8+ en comparación con un valor de referencia, por ejemplo, un número de células T CD8+ de un no respondedor;
(iii) tiene un menor número de células inmunitarias que expresan uno o más inhibidores de puntos de control, por

ejemplo, un inhibidor de punto de control elegido de PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, o KLRG-1, o una combinación, en comparación con un valor de referencia, por ejemplo, un número de células que expresan uno o más inhibidores de punto de control de un no respondedor; o
(iv) tiene un número mayor de una, dos, tres, cuatro o más (todas) de células TEFF en reposo, células T_{REG} en reposo, células CD4 sin tratar, células de memoria no estimuladas o células T de memoria temprana, o una combinación de las mismas, en comparación con un valor de referencia, por ejemplo, un número no respondedor de células T_{FEP} en reposo, células T_{REG} en reposo, células CD4 sin tratar, células de memoria no estimuladas o células T de memoria temprana.

[0705] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el nivel de citocinas o la actividad de (vi) se selecciona de entre una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, o más (o todos) de citocina CCL20/MIP3a, IL17A, IL6, GM-CSF, IFNγ, IL-10, IL13, IL2, IL21, IL-4, IL5, IL-9 o TNFα, o una combinación de las mismas. La citocina puede elegirse de una, dos, tres, cuatro o más (todas) de IL-17A, CCL20, IL2, IL6, o TNFa. En un ejemplo, un aumento del nivel o la actividad de una citocina seleccionada de entre una o ambas de IL-17A y CCL20, es indicativo de mayor capacidad de respuesta o disminución de la recaída.

[0706] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, una eficacia de transducción de 15% o superior en (vii) es indicativo de mayor capacidad de respuesta o disminución de la recaída.

[0707] En algunos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, una eficacia de transducción de menos del 15% en (vii) es indicativo de una capacidad de respuesta disminuida o un aumento de la recaída.

[0708] En los ejemplos, el respondedor, un no respondedor, un sujeto con recaída o un sujeto sin recaídar identificados por los procedimientos del presente documento pueden evaluarse adicionalmente de acuerdo con los criterios clínicos. Por ejemplo, un respondedor completo tiene, o se identifica como, un sujeto que tiene una enfermedad, por ejemplo, un cáncer, que exhibe una respuesta completa, por ejemplo, una remisión completa, a un tratamiento. Una respuesta completa se puede identificar, por ejemplo, usando la NCCN Guidelines®, tal como se describe en el presente documento. Un respondedor parcial tiene, o se identifica como, un sujeto que tiene una enfermedad, por ejemplo, un cáncer, que exhibe una respuesta parcial, por ejemplo, una remisión parcial, a un tratamiento. Una respuesta parcial se puede identificar, por ejemplo, usando la NCCN Guidelines®, tal como se describe en el presente documento. Un no respondedor tiene, o se identifica como, un sujeto que tiene una enfermedad, por ejemplo, un cáncer, que no presenta una respuesta a un tratamiento, por ejemplo, el paciente tiene una enfermedad estable o enfermedad progresiva. A no respondedor puede ser identificado, por ejemplo, usando la NCCN Guidelines®, tal como se describe en el presente documento.

[0709] Alternativamente, o en combinación con los procedimientos descritos en el presente documento, que responden a dicho valor, la realización de uno, dos, tres, cuatro o más de:
administrar por ejemplo, a un respondedor o un sujeto sin recaída, de una terapia con células que expresan CAR;
administrar una dosificación alterada de una terapia con células que expresan CAR;
alterar la programación o la evolución con el tiempo de una terapia con células que expresan CAR;
administrar, por ejemplo, a un no respondedor o un respondedor parcial, un agente adicional en combinación con una terapia con células que expresan CAR, por ejemplo, un inhibidor de punto de control, por ejemplo, un inhibidor de punto de control que se describe en el presente documento;
administrar a un no respondedor o respondedor parcial una terapia que aumenta el número de células T más jóvenes en el sujeto antes del tratamiento con una terapia con células que expresan CAR;
modificar un proceso de fabricación de una terapia con células que expresan CAR, por ejemplo, enriqueciendo las células T más jóvenes antes de la introducción de un ácido nucleico que codifica un CAR, o el aumento de la eficacia de transducción, por ejemplo, para un sujeto identificado como un no respondedor o un respondedor parcial;
administrar una terapia alternativa, por ejemplo, para un no respondedor o respondedor parcial o un sujeto con recaída; o
si el sujeto es, o se identifica como, un no respondedor o un sujeto con recaída, disminuir la población de células TREG y/o la firma genética de T_{REG}, por ejemplo, mediante uno o más de agotamiento de CD25, administración de ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, o una de sus combinaciones.

[0710] En ciertos casos, el sujeto es tratado previamente con un anticuerpo anti-GITR. En cierto ejemplo, el sujeto se trata con un anticuerpo anti-GITR antes de la infusión o re-infusión.

PROCEDIMIENTOS DE SUMINISTRO DE BIOPOLÍMEROS

[0711] En algunos casos, una o más células que expresan CAR descritas en el presente documento, opcionalmente en combinación con una dosis baja que mejora la inmunidad de un inhibidor de mTOR (por ejemplo, un inhibidor de mTOR que se describe en el presente documento) se pueden administrar o suministrar al sujeto a través de un andamio de biopolímero, por ejemplo, un implante de biopolímero. Los andamios de biopolímero pueden apoyar o mejorar el suministro, la expansión, y/o dispersión de las células que expresan CAR descritas en el presente documento. Un andamio de biopolímero comprende un polímero biocompatible (por ejemplo, no induce

sustancialmente una respuesta inflamatoria o inmunitaria) y/o un polímero biodegradable que puede ser de origen natural o sintético.

[0712] Los ejemplos de biopolímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, agar, agarosa, alginato, alginato/cemento de fosfato de calcio (CPC), beta-galactosidasa (β-GAL), (1,2,3,4,6 pentaacetil α-D-galactosa), celulosa, quitina, quitosano, colágeno, elastina, gelatina, colágeno ácido hialurónico, hidroxiapatita, poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxi-hexanoato) (PHBHHx), poli (lactida), poli (caprolactona) (PCL), poli (lactida-co-glicolida) (PLG), óxido de polietileno (PEO), poli (láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), óxido de polipropileno (PPO), alcohol polivinílico) (PVA), seda, proteína de soja, y proteína de soja aislada, solo o en combinación con cualquier otra composición de polímero, en cualquier concentración y en cualquier proporción. El biopolímero puede aumentarse o modificarse con moléculas que promueven la adhesion o migración, por ejemplo, los péptidos miméticos de colágeno que se unen al receptor de colágeno de los linfocitos, y/o moléculas estimuladoras para mejorar el suministro, expansión, o función, por ejemplo, actividad anticáncer, de las células a suministrar. El andamio de biopolímero puede ser, por ejemplo, un gel inyectable o un semi-sólido, o una composición sólida.

[0713] En algunos casos, las células que expresan CAR descritos en el presente documento se siembran sobre un andamio de biopolímero antes del suministro al sujeto. En los ejemplos, el andamio de biopolímero comprende además uno o más agentes terapéuticos adicionales descritos en el presente documento (por ejemplo, otra célula que expresa CAR, un anticuerpo, o una molécula pequeña), o agentes que mejoran la actividad de una célula que expresa CAR, por ejemplo, incorporados o conjugados con los biopolímeros del andamio. En los ejemplos, se inyecta el andamio biopolímero, por ejemplo, por vía intratumoral, o se implanta quirúrgicamente en el tumor o dentro de una proximidad del tumor suficiente para mediar en un efecto antitumoral. Ejemplos adicionales de composiciones de biopolímeros y procedimientos para su suministro se describen en Stephan et al, Nature Biotechnology, 2015, 33: 97-101; y WO2014/110591.

EJEMPLOS

[0714] La invención se describe adicionalmente en detalle por referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan para fines de ilustración solamente, y no pretenden ser limitativos, a menos que se especifique lo contrario. De este modo, la invención de ninguna manera debería ser interpretada como limitada a los siguientes ejemplos, sino más bien, debe interpretarse para abarcar cualquiera y todas las variaciones que se hacen evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en el presente documento.

[0715] Sin más descripción, se cree que un experto en la técnica puede, usando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, producir y utilizar los compuestos de la presente descripción y practicar los procedimientos descritos. Los siguientes ejemplos de trabajo apuntan específicamente diversos aspectos de la presente invención, y pretenden ser interpretados como limitantes en modo alguno del resto de la descripción.

Ejemplo 1: Análisis de combinaciones de células T CD4+ y CD8+ redirigidas con los CAR que contienen diferentes dominios coestimuladores

[0716] Los siguientes materiales y procedimientos se utilizaron para probar si las células T CD4+ y CD8+ requieren de citocinas distintas y de señales de coestimulación para una persistencia óptimo, y si la redirección adecuada de células T CD4+ pueden ser clave para sostener la persistencia y eliminación de células T CD8+, tal como se describe con más detalle en los Ejemplos 2-6.

Aislamiento, transducción y expansión de linfocitos T humanos primarios.

[0717] Las muestras de sangre se obtuvieron de la Human Immunology Core de la Universidad de Pennsylvania. Se aislaron negativamente células T CD4+ y CD8+ de sangre periférica utilizando kits RosetteSep (Stem Cell Technologies). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con FCS al 10%, 100-U/ml de penicilina, 100 μg/ml de sulfato de estreptomicina, HEPES 10 mM en una incubadora a 37 °C y CO2 al 5%. Para la estimulación, las células T CD4+ y CD8+ se cultivaron con perlas activantes recubiertas con anticuerpos para CD3 y CD28 en una proporción de células a perla de 1:2. Aproximadamente 24 h después de la activación, las células T se transdujeron con vectores lentivirales en una MOI de 5. Para células T CD8+, se añadió IL-2 humana (Chiron) cada dos días hasta una concentración final de 30 UI/ml. Se contaron las células y se alimentaron cada 2 días y una vez las células T parecieron reposar, tal como se determina tanto por la disminución de la cinética de crecimiento como por el tamaño de las células, se utilizaron para ensayos funcionales o se crioconservaron. Todos los ensayos funcionales de las células T se realizaron en medios sin citocinas.

Polarización de células por T_H17

[0718] Para la polarización por T_H17, las célula T CD4+ se estimularon con perlas activantes recubiertas con anticuerpos para CD3 y ICOS en una proporción de células a perla 1:3 y se cultivaron en presencia de IL-1β (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), IL-23 (20 ng/ml), y anticuerpos neutralizantes (10 μg/ml) contra IL-4 e IFN-γ (eBioscience). Todos los experimentos se realizaron con suero de ternera fetal que contenía fuentes endógenas de

TGF-β. Se añadió IL-2 humana (Chiron) 3 días después de la activación hasta una concentración final de 50 UI/ml.

Ensayos de citotoxicidad

[0719] Para los ensayos de bioluminiscencia basados en células, se cultivaron 10 x 10^4 células tumorales que expresan luciferasa de luciérnaga (fLuc) (L55) con medio R10 en presencia de diferentes proporciones de células T transducidas con el uso de una microplaca de 96 pocillos (BD Biosciences). Después de incubación durante aproximadamente 18 horas a 37 ° C, las células se lisaron con tampón de lisis de ensayo de luciferasa y el reactivo de luciferasa se añadió en cada pocillo, tal como se describe en las instrucciones del fabricante. La lisis específica se calculó como la luminiscencia media de la muestra experimental menos lisis espontánea, dividido por la luminiscencia media de la lisis máxima menos lisis espontánea por 100. Todos los datos se representan como una media de pocillos por triplicado.

Producción de citocinas de las células T reestimuladas.

[0720] Se descongelaron células T crioconservadas que expresan los CAR SS1, se lavaron, y se colocaron en cultivo durante 16 h. A continuación, se cocultivaron células T (4 x 10^5) con 2 x 10^5 células tumorales que expresan mesotelina y los sobrenadantes se recogieron 24 h más tarde. Los cultivos de células T se normalizaron a la expresión de CAR equivalente mediante la adición de células T transducidas simuladas, según se requiera. Las concentraciones de IL-2, IFN-γ, TNF-α, se determinaron usando los sistemas de desarrollo ELISA DuoSet®.

Citometría de flujo

[0721] Los siguientes anticuerpos conjugados se adquirieron de eBioscience: anti-CD8 APC, anti-CD4-PE, anti-CD45 PerCp-Cy5.5. Se detectó la expresión de las diversas proteínas de fusión SS1 scFv en las células T usando IgG anti-ratón de cabra biotinilado (específica para scFv de origen murino) de Jackson ImmunoResearch. Se adquirieron estreptavidina (PE) y estreptavidina (APC) de BD Biosciences. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo LSRII usando el software DiVa (BD Biosciences), y los resultados se evaluaron utilizando el software FlowJo (TreeStar).

Ratones

[0722] La comisión institucional del cuidado y uso de animales de la Universidad de Pennsylvania aprobó todos los experimentos con animales. Los ratones NSG fueron adquiridos de The Jackson Laboratory y se criaron en el vivero de la Universidad de Pennsylvania. Los ratones se alojaron en condiciones específicas libres de patógenos en jaulas microaislantes y se les proporcionó acceso ad libitum al alimento tratado en autoclave y agua acidificada.

Evaluación In vivo de células T CAR anti-mesotelina.

[0723] Se establecieron tumores de xenoinjertos mediante inyección subcutánea de 5x10^6 células L55, SKOV3 o Capan-2 en presencia de una solución al 50% de Matrigel (BD Biosciences) en PBS. Los tumores L55 y SKOV3 se dejaron crecer en ratones NSG durante 2 o 4 semanas y los tumores Capan-2 crecieron durante 2 semanas. La ruta, dosis y la programación de inyecciones de células T se indica en las leyendas de las figuras individuales. Las dimensiones de los tumores se midieron con calibradores, y los volúmenes tumorales se calcularon utilizando la fórmula V = 1/2 x L x W x W, donde L es la longitud (dimensión más larga) y W es la anchura (dimensión más corta). La sangre periférica se obtuvo de sangrado retro-orbital o punción intracardiaca y se tiñeron por la presencia de células T CD45, CD4 y CD8 humanas. Después de filtrar la población de CD45+ humana, los subconjuntos de CD4+ y CD8+ se cuantificaron utilizando tubos TruCOUNT (BD Biosciences). Todos los experimentos se llevaron a cabo de un modo ciego, aleatorizado.

Ejemplo 2: Evaluación in vitro de células T CD4+ y CD8+ redirigidas con SS1-CAR que contienen diferentes dominios coestimuladoras

[0724] Se examinó el potencial antitumoral in vitro de células T CD4+ y CD8+ redirigidas con los CAR que contienen la SS1 scFv que reconoce la mesotelina humana (SS1 CARs). El scFv se fusiona con el dominio de transducción de señales TCR-ζ (z) con los dominios coestimuladores de señalización CD28, 41BB o ICOS en tándem. El SS1 CAR que contiene un dominio TCR-ζ y un dominio coestimulador CD28 se conoce como 28z; SS1 CAR que contiene un dominio TCR-ζ y un dominio coestimulador 4-1BB se conoce como BBz; y SS1 CAR que contiene un dominio TCR-ζ y un dominio coestimulador ICOS se conoce como ICOSz. Los diagramas de las construcciones de CAR de mesotelina se muestran en la Figura 1A. Como control negativo para la transducción de señales, se puede utilizar un receptor quimérico que contiene una forma truncada del dominio intracelular de TCR-ζ (Dz).

[0725] Las células T CD4+ y CD8+ redirigidos con SS1-CARs se cocultivaron cada una con células de carcinoma de pulmón de células no pequeña que expresan luciferasa de luciérnaga (fLuc) (L55) (que expresan mesotelina) durante 18 horas a las relaciones effector-diana (E:T) indicadas. La citolisis específica se determinó usando un

ensayo de bioluminiscencia basado en células, tal como se describe con más detalle en el Ejemplo 1. Como se muestra en las Figuras 2A y 2B, ambas células T CD4 + y CD8+ redirigidas lisaron eficientemente las células de carcinoma de pulmón de célula no pequeña (L55), aunque las células T CD8+ (figura 2B) eliminaron las células tumorales a una menor relación E:T que las células T CD4+ (Fig 2A). No se observaron diferencias en la citotoxicidad entre los diferentes dominios de señalización de CAR (por ejemplo, CD28, 4-1-BB, e ICOS).

[0726] La liberación de citocinas in vitro de las células T CD4+ y CD8+ redirigidas se midió después de la exposición a las células tumorales que expresan mesotelina: L55 (células tumorales de pulmón de célula no pequeña), AsPC1 (células tumorales pancreáticas), Capan2 (células tumorales pancreáticas), y células de tumor de ovario (SKOV3). Las células T CD4+ y T CD8+ redirigidas con SS1 CARs (28z, Bbz, ICOSz) se cocultivaron con $2x10^5$ de las células tumorales que expresan mesotelina durante 24 horas. El sobrenadante del medio se recogió y se determinaron las concentraciones de TNF-α, IL-2 e IFN-γ utilizando el sistemas de desarrollo de ELISA DuoSet® (R & D Systems). Las células T redirigidas con el CAR 28z secretaron mayores niveles de IL-2 (Fig. 3B y 3D) y TNF-α (Fig. 3A) en comparación con el control (CD3z), mientras que las células T CD8+ redirigidas con 28z y ICOSz CARs mostraron niveles similares de IFN-γ (Fig. 3E).

Ejemplo 3: Evaluación in vivo de la persistencia de células T de células T CD4+ y CD8+ redirigidas con SS1-CAR que contienen diferentes dominios coestimuladores

[0727] Se analizó la persistencia de células T in vivo de células T CD4+ y CD8+ redirigidas con el mismo CAR (z, 28Z, BBz, ICOSz) o con diferentes CARs que reconocen la mesotelina (SS1 CAR). Las células T CD4+ y CD8+ se redirigieron con los mismos CARs (por ejemplo, los CAR que contienen los mismos dominios coestimuladores z, 28z, BBz, o ICOSz; véase la Fig. 4A) o CAR diferentes (por ejemplo, las células T CD8+ fueron redirigidas con CAR que contienen BBz, mientras que las células T CD4+ fueron redirigidas con CAR diferentes que contienen 28z, BBz, o ICOSz, véase la figura 4B;. o células T CD4+ se redirigieron con CAR que contienes ICOSz, mientras que las células T CD8+ fueron redirigidas con CAR diferentes que contienen 28z , BBz, o ICOSz, véase la Fig. 4C) Se trataron ratnes NSG portadores de tumores de pulmón de célula no pequeña subcutáneos (L55) 30 días después de la implantación del tumor con dos dosis de células T CD4+ y CD8+ redirigidas ($10x10^6$ células T por dosis , 60-70% CAR+). La segunda dosis se administró 8 días después de la primera dosis. Se obtuvo sangre 22 días después de la primera inyección de células T y se cuantificó la presencia de células T CD4+ y CD8+ para determinar la persistencia de células T CD4+ o CD8+. La persistencia de células T in vivo de células T CD4+ se muestra en la Figura 4, mientras que la persistencia in vivo de células T de células T CD8+ se muestra en la Figura 5.

[0728] Los resultados de los experimentos descritos anteriormente indicaron que la redirección de células T CD4+ con un CAR basado en ICOS mejoró la persistencia de células T CD4+ cuando se comparó con células redirigidas con un CAR sin ningún dominio coestimulador (z) (Fig. 4A). Por el contrario, las células T CD4+ redirigidas con CAR basados en CD28 o 4-1BB mostraron una persistencia deteriorada (Fig. 4B). La persistencia mejorada de células T CD4+ con CAR basado en ICOS fue independiente del CAR utilizado para redirigir las células T CD8+, ya que se demostró la persistencia mejorada de células T de células T CD4+ mediante el uso de un CAR con cualquier dominio coestimulador.

[0729] Por el contrario, la persistencia de células T CD8+ era altamente dependiente del CAR usado para redirigir células T CD4+. La redirección de células T CD4+ con un CAR basado en ICOS aumentó significativamente la persistencia de células T CD8+ redirigidas con CD28 (Fig. 5C) o CAR basado en 4-1BB (Fig. 5B). El grupo de ratones que mostró una mejor persistencia de células T CD8+ fue el que recibió células T CD4+ redirigidas con ICOSz y células T CD8+ redirigidas con BBz (grupo ICOSz-BBz) (Fig. 5B en comparación con Fig. 5C). El número medio de células T por μl de sangre en los ratones tratados con células T ICOSz-BBz fue 7 veces, 2800 veces, 17 veces y 5 veces mayor cuando se comparó con los grupos z-z, 28z-28z, BBz-BBz o ICOSz-ICOSz, respectivamente (cuando ambas células T CD4+ y CD8+ se redirigieron con el mismo CAR) (Fig. 5B en comparación con Fig. 5A).

[0730] Además, se examinó la persistencia in vivo de células T CD4+ y CD8+ cuando se cultivaron las células T CD4+ en condiciones polarizantes con Th17. Células T CD4+ redirigidas con CAR basado en ICOS se cultivaron en condiciones polarizantes con Th17, tal como se describe en el Ejemplo 1, para producir células Th17 redirigidas con CAR basado en ICOS, o se cultivaron en condiciones de expansión estándar. Se trataron ratones NSG portadores de tumores subcutáneos de pulmón de célula no pequeña (L55) 30 días después de la implantación del tumor con dos dosis de células T CD8+ redirigidas con SS1-CAR que contenía BBz, y, o bien, células T CD4+ redirigidas con SS1-CAR que contenía ICOSz, o bien, células Th17 redirigidas con SS1-CAR que contenía ICOSz. La persistencia de células T de las células T CD4+ y células T CD8+ se midió mediante la cuantificación del número de células T CD4+ y células T CD8+ en la sangre de animales tratados 22 días después de la inyección de células T. Los resultados demuestran que el cultivo de células T CD4+ en condiciones polarizantes con Th17 mejora aún más la persistencia de células T CD4+ redirigidas con ICOS (Fig. 6A). Es importante destacar que, las células T polarizadas con Th17 que expresan un CAR basado en ICOS también aumentaron significativamente la persistencia circulatoria de células T CD8+ en masa que expresan un CAR basado en 4-1BB cuando se compara con células T CD4+ no polarizadas (Fig. 6B).

Ejemplo 4: Evaluación in vivo de la actividad antitumoral e infiltración tumoral de células T CD4+ y CD8+ redirigidas

con SS1-CAR que contienen diferentes dominios coestimuladores

[0731] A continuación, se hizo otro experimento in vivo donde todas las células T CD8+ se redirigieron con un CAR 28z y las células T CD4+ se redirigieron con 28z, BBz, ICOSz o se dejaron sin transducir. Se trataron ratones NSG portadores de tumores L55 16 días después de la implantación del tumor con dos dosis de células T redirigidas ($10x10^6$ células T por dosis, CD4+ eran 40% CAR+ y células CD8+ eran 80% CAR+). Se observó un efecto antitumoral significativo en los grupos donde las células T CD4+ se redirigieron con 28z o ICOSz en comparación con los animales no tratados o los animales tratados con UTD CD4+ y 28z CD8+ (UTD-28z), indicando que la redirección de las células CD4+T con un CAR apropiado es crítica para el efecto antitumoral (Fig. 7). Como anteriormente, la redirección de células T CD4+ con un CAR basado en ICOS mejoró la persistencia de ambas células T CD4+ y CD8+. Es importante destacar que los ratones tratados con células T CD4+ que expresan un CAR basado en ICOS mostró mayor infiltración de células T CD4+ en los tumores, un efecto que fue mayor cuando se cultivaron células T CD4+ bajo condiciones polarizantes con Th17 (Fig. 8).

Ejemplo 5: Evaluación in vivo de células T CD4+ y CD8+ redirigidas con MOv19-CAR que contienen diferentes dominios coestimuladores

[0732] Para confirmar los resultados obtenidos con los SS1-CAR (por ejemplo, los resultados descritos en los Ejemplos 2-4), las células T modificadas para expresar un MOv19-CAR (un CAR específico para Receptor-α de folato) se examinaron en experimentos similares a los descritos anteriormente. Para estos experimentos, se utilizaron las construcciones de CAR MOv19 con los dominios estimuladores y coestimuladores, tal como se muestran en la Figura 1B.

[0733] Todas las células CD8+ fueron diseñadas para expresar un CAR MOv19-BBz, mientras que las células T CD4+ se dejaron sin transducir (UTD) o se modificaron para expresar CAR z, 28Z, BBz o ICOSz MOv19. Se trataron ratones NSG portadores de tumores de ovario (SKOV3) 30 días después de la implantación del tumor con dos dosis de células T redirigidas ($10x10^6$ células T por dosis, 80% CAR+). La segunda dosis se administró 8 días después de la primera dosis. Todos los ratones tratados con células T redirigidas mostró grandes respuestas antitumorales (Fig. 9A), por ejemplo, una disminución significativa en el volumen del tumor o la regresión del tumor.

[0734] La persistencia de células T CD4+ y células T CD8+ también se midió para cada una de las combinaciones de células T CD4+ y CD8+ redirigidas mediante la cuantificación del número de células T CD4+ y CD8+ circulantes en la sangre de los animales tratados. Las células T CD4+ redirigidss con un CAR basado en ICOS mostraron una mayor persistencia en comparación con combinaciones con células T CD4+ redirigidas con los CAR que contienen otros dominios coestimuladores (distintos de ICOS) (Fig. 9B). Esta persistencia mejorada de células T CD4+ se correlacionó con una persistencia mejorada de células T CD8+ acompañantes modificadas para expresar MOv19-BBz (Fig. 9C).

Ejemplo 6: Combinación de células T CD4+ redirigidas con CAR basado en ICOS con células T CD8+ redirigidas con dos CAR que contienen diferentes dominios coestimuladores

[0735] En general, los resultados descritos anteriormente (por ejemplo, en los Ejemplos 2-5) demuestran que las células T CD4+ y CD8+ requieren ser redirigidos con CAR con diferentes dominios intracelulares. La redirección de células T CD4+ con un CAR basado en ICOS aumentó la persistencia de las células T CD4+, así como la persistencia de las células T CD8+ acompañantes (Fig. 4). Por el contrario, las células T CD8+ mostraron una persistencia mejorada cuando se redirigieron con los CAR que contienen el dominio coestimulador 4-1BB (Fig. 5). Las células T redirigidas con CAR basado en CD28 mostraron una liberación ligeramente mejor de citocinas y un efecto antitumoral, pero una persistencia in vivo muy mala (Fig. 3).

[0736] Por lo tanto, una combinación de células T CD4+ redirigidas con ICOSz y células T CD8+ redirigidas con una mezcla de CAR 28z y Bbz se examinó para la actividad antitumoral y la persistencia de células T. Se trataron ratones portadores de tumores de ovario (SKOV3), páncreas (Capan-2) o pulmón (L55) con dos inyecciones intratumorales de la terapia de combinación. Esta terapia fue capaz de controlar o erradicar grandes tumores establecidos de diferentes orígenes, con un 86% de los tumores respondiendo al tratamiento (Fig. 10A, 10B, y 10C). Además, la terapia de combinación mostró una gran persistencia de células T en todos los ratones tratados (Fig. 10D).

Ejemplo 7: Evaluación in vivo de subconjuntos de células T CD4+ y CD8+ que expresan CAR que contiene un dominio ICOS mutante

[0737] En el siguiente experimento, se examina el efecto antitumoral in vivo y la persistencia de células T de un CAR ICOSz con una mutación (Y a F) en el motivo YMFM (SEQ ID NO: 85) del dominio intracelular ICOS. La cola citoplasmática de este ICOS mutante llamado ICOS (FMFM)z, ("FMFM" descrito como SEQ ID NO: 47), tiene una mutación en el sitio que interactúa con P13K (Fig 11A.) y no puede activar PI3K. Para este experimento, todas las células T CD8+ fueron redirigidas con un CAR BBz y las células T CD4+ fueron redirigidas con delz, BBz, ICOSz o ICOS (FMFM)z ("FMFM" descrito como SEQ ID NO: 47). Las construcciones CAR utilizadas en este ejemplo tienen

un dominio de unión a antígeno que reconoce mesotelina (dominio de unión a antígeno SS1), y las representaciones esquemáticas de las construcciones se muestran en la Figura 1A. La construcción de CAR delz (Dz) que carece de dominios de señalización intracelular (ver Fig. 1A) se utilizó como control negativo para la señalización. Se trataron ratones NSG portadores de tumores pancreáticos Capan2 15 días después de la implantación del tumor con dos dosis de células T redirigidas ($10x10^6$ células T por dosis, 50% CAR+). La segunda dosis se administró 8 días después de la primera dosis.

[0738] Se observó un efecto antitumoral significativo en grupos donde las células T CD4+ se redirigieron con ICOSz o ICOS (FMFM)z ("FMFM" descrito como SEQ ID NO: 47) en comparación con animales no tratados o animales tratados con CD4+ delz (Δz) y BBz CD4+, lo que indica que la redirección de células T CD4+ con un CAR apropiado es crítica para el efecto antitumoral (Fig. 11B). El tratamiento de células T CD4+ que expresan ICOS (FMFM)z ("FMFM" descrito como SEQ ID NO: 47) con las células T CD8+ que expresan BBz mostró el mejor efecto antitumoral. La persistencia tumoral también se analizó, tal como se describe en los Ejemplos anteriores, y se encontró que las células T CD4+ que expresan ICOSz (FMFM) ("FMFM" descrito como SEQ ID NO: 47) persistían en un número similar en ratones portadores de tumor como células T CD4+ que expresan células ICOSz (Fig. 11C). Estos resultados indican que los mecanismos de señalización de ICOS independientes de PI3K pueden contribuir a la coestimulación de células T durante el rechazo del tumor.

Ejemplo 8: Dosis baja de RAD001 estimula la proliferación de CAR en un modelo de cultivo celular

[0739] El efecto de dosis bajas de RAD001 sobre la proliferación de células T CAR in vitro se evaluó mediante cocultivo de células que expresan CART con células diana en presencia de diferentes concentraciones de RAD001.

Materiales y procedimientos

Generación de células T transducidas con CAR

[0740] Se utilizó un vector de transferencia lentiviral de CAD CD19 anti-humano CD19 humanizado (huCART19) para producir el material genómico empaquetado en partículas lentivirales pseudotipadas con VSVg. La secuencia de aminoácidos y de nucleótidos de la CAR CD19 anti-humano humanizado (huCART19) es CAR 1, ID 104875, que se describe en la publicación PCT, WO2014/153270, presentada el 15 de marzo de 2014, y se designa SEQ ID NOs. 85 y 31 en la misma.

[0741] ADN vector de transferencia lentiviral se mezcla con los tres componentes de empaquetamiento VSVG env, gag/pol y rev en combinación con el reactivo de lipofectamina para transfectar células Lenti-X 293T. El medio se cambia después de 24 h y 30h a partir de entonces, los medios que contienen virus se recogieron, se filtraron y se almacenaron a -80 °C. Las CART se generaron por transducción de células T sin tratar frescas o congeladas obtenidas por selección magnética negativa de la sangre de donantes sanos o leukopak. Las células T se activan mediante incubación con perlas anti-CD3/anti-CD28 durante 24 h, después de lo cual el sobrenadante viral o virus concentrado (MOI = 2 o 10, respectivamente) se añaden a los cultivos. Se deja que las células T modificadas se expandan durante aproximadamente 10 días. El porcentaje de células transducidas (que expresan los CAR en la superficie de la célula) y el nivel de expresión de CAR (intensidad de fluorescencia relativa, Geo Mean) se determinan mediante análisis de citometría de flujo entre los días 7 y 9. La combinación de la tasa de desaceleración del crecimiento y tamaño de las células T que se acerca a ~ 350 fL determina el estado de las células T para ser criosonservadas para su posterior análisis.

Evaluación de la proliferación de CART

[0742] Para evaluar la funcionalidad de los CART, las células T se descongelan y se cuentan, y la viabilidad se evalúa por Cellometer. El número de células positivas de CAR de cada cultivo se normaliza mediante células T no transducidas (UTD). El impacto de RAD001 en CART se probó en titulaciones con RAD001, a partir de 50 nM. La línea celular diana usada en todos los experimentos de co-cultivo es NALM6 (Nalm-6), un línea celular de leucemia linfoblástica aguda (ALL) de células pre-B humanas que expresan CD 19 y se transducen para expresar luciferasa.

[0743] Para la medición de la proliferación de CART, las células T se cultivan con las células diana en una proporción de 1:1. El ensayo se realiza durante 4 días, cuando las células se tiñeron para la expresión de CD3, CD4, CD8 y CAR. El número de células T se evaluó por citometría de flujo utilizando el recuento de perlas como referencia.

Resultados

[0744] La capacidad proliferativa de las células CART se ensayó en un ensayo de cocultivo de 4 días. El número de células T CAR-positivas CD3-T positivas (barras oscuras) y células T positivas para CD3 totales (barras claras) se evaluó después de cultivar las células T transducidas con CAR y no transducidas con NALM6 (Nalm-6) (Fig. 12). Las células huCART19 se expandieron cuando se cultivaron en presencia de menos de 0,016 nM de RAD001, y en menor medida en concentraciones más altas del compuesto. Es importante destacar que, tanto a 0,0032 como

0,016 nM de RAD001, la proliferación fue mayor que la observada sin la adición de RAD001. Las células T no transducidas (UTD) no mostraron expansión detectable.

Ejemplo 9: Dosis baja de RAD001 estimula la expansión de CART in vivo

[0745] En este ejemplo se evalúa la capacidad de las células huCAR19 para proliferar in vivo con diferentes concentraciones de RAD001.

Materiales y procedimientos:

[0746] Células NALM6-luc: Se desarrolló una línea celular de leucemia linfoblástica aguda (ALL) humana NALM6 a partir de la sangre periférica de un paciente con ALL con recaída. Después las células se marcaron con luciferasa de luciérnaga. Estas células en suspensión crecieron en RPMI suplementado con suero bovino fetal inactivado con calor al 10%.

[0747] Ratones: ratones NSG de 6 semanas de edad (NOD.Cg-PrkdcscidI12rgtm1 WJ1/SZJ) se adquirieron del Laboratorio Jackson (número Stock 005557).

[0748] Implantación tumoral: Se hicieron crecer y expandieron células NALM6-luc in vitro en RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10% inactovado con calor. Las células después se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml y se lavaron dos veces con PBS estéril frío. Las células NALM6-luc se contaron y se resuspendieron a una concentración de 10x106 células por mililitro de PBS. Las células se colocaron en hielo e inmediatamente (en una hora) se implantaron en los ratones. Se inyectaron células NALM6-luc por vía intravenosa a través de la vena de la cola en un volumen de 100 μl para un total de $1x10^6$ células por ratón.

[0749] Dosificación de células T CAR: A ratones se les administró $5x10^6$ células T CAR 7 días después de la implantación del tumor. Las células se descongelaron parcialmente en un baño de agua a 37 grados Celsius y a continuación se descongelaron completamente mediante la adición de 1 ml de PBS estéril frío al tubo que contenía las células. Las células descongeladas se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml y se ajustaron a un volumen final de 10 ml con PBS. Las células se lavaron dos veces a 1000 rpm durante 10 minutos cada vez y después se contaron en un hemocitómetro. Las células T se resuspendieron a continuación a una concentración de $50x10^6$ células T CAR T por ml de PBS frío y se mantuvieron en hielo hasta que se dosificaron los ratones. Los ratones se inyectaron por vía intravenosa a través de la vena de la cola con 100 μl de las células T CAR para una dosis de $5x10^6$ células T CAR por ratón. Ocho ratones por grupo fueron tratados con 100 μl de PBS solo (PBS), o células T CAR CD19 humanizadAS.

[0750] Dosificación de RAD001: Se frmuló una microemulsión concentrada de 50 mg igual a 1 mg RAD001 y después se resuspendió en D5W (dextrosa al 5% en agua) en el momento de la dosificación. Los ratones se dosificaron diariamente por vía oral (a través de una sonda oral) con 200 μl de las dosis deseadas de RAD001.

[0751] Análisis PK: Los ratones se dosificaron a diario con RAD001 comenzando 7 días después de la implantación del tumor. Los grupos de dosificación fueron los siguientes: 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, y 10 mg/kg. Se sangraron los ratones en los días 0 y 14 después de la primera y última dosis de RAD001, en los siguientes puntos de tiempo para el análisis de PK: 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas y 24 horas.

Resultados:

[0752] La expansión y la farmacocinética de RAD001 se ensayaron en ratones NSG con tumores NALM6-luc. La dosificación oral diaria de RAD001 solo no tuvo impacto en el crecimiento de tumores NALM6-luc (Figura 13). El análisis farmacocinético de RAD001 muestra que es bastante estable en la sangre de ratones portadores de tumor (Figuras 14A y 14B). Los análisis de PK del día 0 y día 14 muestran que las concentraciones RAD001 en la sangre está por encima de 10 nm incluso 24 horas después de la dosificación a la dosis más baja ensayada (0,3 mg/kg).

[0753] En base a estas dosis, las células T CAR huCAR19 se dosificaron con y sin RAD001 para determinar la capacidad proliferativa de estas células. La dosis más alta utilizada fue de 3 mg/kg en base a los niveles de RAD001 en la sangre 24 horas después de la dosificación. Como la concentración de RAD001 estaba por encima de 10 nM 24 horas después de la dosis final de RAD001, se utilizaron varias dosis más bajas de RAD001 en el estudio in vivo con células T CAR. Las células T CAR se dosificaron IV un día antes del comienzo de la dosificación diaria oral de RAD001. Los ratones se controlaron mediante FACS para la expansión de células T.

[0754] Las dosis más bajas de RAD001 muestran una mayor proliferación de las células T CAR (Figuras 15A y 15B). Esta proliferación mejorada es más evidente y prolongada con las células T CAR CD4+ que las células T CAR CD8+. Sin embargo, con las células T CAR CD8+, la proliferación mejorada se puede ver en los puntos de tiempo tempranos después de la dosis de células T CAR.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0755]

<110> NOVARTIS AG THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

<120> SUBCONJUNTO OPTIMIZADO DE CÉLULAS QUE CONTIENEN UN RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO

<130> N2067-70660WO

<140>
<141>

<150> 62/031,699
<151> 2014-07-31

<160> 109

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1184
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 1
cgtgaggctc cggtgcccgt cagtgggcag agcgcacatc gcccacagtc cccgagaagt 60

tgggggggagg ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaactggg 120

aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccgaggg tgggggagaa ccgtatataa 180

gtgcagtagt cgccgtgaac gttcttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa 240

gtgccgtgtg tggttcccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggccct tgcgtgcctt 300

gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg 360

ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagcccttc gcctcgtgct tgagttgagg 420

cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg 480

ctgctttcga taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgcttttt 540

tctggcaaga tagtcttgta aatgcgggcc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg 600

gggccgcggg cggcgacggg gcccgtgcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc 660

tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg 720

tgcctggcct cgcgccgccg tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780

caccagttgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat 840

ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct 900

ttccgtcctc agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccaggcacc 960

tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttgggggggag gggttttatg 1020

cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080

tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc 1140

agacagtggt tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgtc gtga 1184

<210> 2
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 2
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> 3
<211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucléotido sintético"

<400> 3
atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga 60

ccc 63

<210> 4
<211> 45
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 4
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
35 40 45

<210> 5
<211> 135
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 5
accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg 60

tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcgggggcg cagtgcacac gagggggctg 120

gacttcgcct gtgat 135

<210> 6
<211> 230
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 6
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

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

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys Met
225 230

<210> 7
<211> 690
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 7
gagagcaagt acggccctcc ctgcccccct tgccctgccc ccgagttcct gggcggaccc 60

agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagccg gacccccgag 120

gtgacctgtg tggtggtgga cgtgtcccag gaggaccccg aggtccagtt caactggtac 180

gtggacggcg tggaggtgca caacgccaag accaagcccc gggaggagca gttcaatagc 240

acctaccggg tggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa 300

tacaagtgta aggtgtccaa caagggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaag 360

gccaagggcc agcctcggga gccccaggtg tacaccctgc cccctagcca agaggagatg 420

accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggct tctaccccag cgacatcgcc 480

gtggagtggg agagcaacgg ccagcccgag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 540

gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc cggctgaccg tggacaagag ccggtggcag 600

gagggcaacg tctttagctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacacccag 660

aagagcctga gcctgtccct gggcaagatg 690

<210> 8
<211> 282
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 8
Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala
1 5 10 15

Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala
20 25 30

Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys
35 40 45

Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro

50 55 60

Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln
65 70 75 80

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

Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val
100 105 110

Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly
115 120 125

Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn
130 135 140

Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro
145 150 155 160

Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys
165 170 175

Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser
180 185 190

Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu
195 200 205

Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro
210 215 220

Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser
225 230 235 240

Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr
245 250 255

Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg
260 265 270

Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His
275 280

<210> 9
<211> 847
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 9
aggtggcccg aaagtcccaa ggcccaggca tctagtgttc ctactgcaca gccccaggca 60

gaaggcagcc tagccaaagc tactactgca cctgccacta cgcgcaatac tggccgtggc 120

ggggaggaga agaaaaagga gaaagagaaa gaagaacagg aagagaggga gaccaagacc 180

cctgaatgtc catcccatac ccagccgctg ggcgtctatc tcttgactcc cgcagtacag 240

gacttgtggc ttagagataa ggccaccttt acatgtttcg tcgtgggctc tgacctgaag 300

gatgcccatt tgacttggga ggttgccgga aaggtaccca cagggggggt tgaggaaggg 360

ttgctggagc gccattccaa tggctctcag agccagcact caagactcac ccttccgaga 420

tccctgtgga acgccgggac ctctgtcaca tgtactctaa atcatcctag cctgccccca 480

cagcgtctga tggcccttag agagccagcc gcccaggcac cagttaagct tagcctgaat 540

ctgctcgcca gtagtgatcc cccagaggcc gccagctggc tcttatgcga agtgtccggc 600

tttagcccgc ccaacatctt gctcatgtgg ctggaggacc agcgagaagt gaacaccagc 660

ggcttcgctc cagcccggcc cccaccccag ccgggttcta ccacattctg ggcctggagt 720

gtcttaaggg tcccagcacc acctagcccc cagccagcca catacacctg tgttgtgtcc 780

catgaagata gcaggaccct gctaaatgct tctaggagtc tggaggtttc ctacgtgact 840

gaccatt 847

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 10
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 11
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucléotido sintético"

<400> 11
ggtggcggag gttctggagg tggaggttcc 30

<210> 12
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 12
Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
20

<210> 13
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucléotido sintético"

<400> 13
atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggtcc ttctcctgtc actggttatc 60

acccttttact gc 72

<210> 14
<211> 42
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 14
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 15
<211> 126
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 15
aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60

actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120

gaactg 126

<210> 16
<211> 48
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 16
Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro
1 5 10 15

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

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

<210> 17
<211> 123
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 17
aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60

gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120

tcc 123

<210> 18
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 18
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys 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 Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
50 55 60

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

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

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105

<210> 19
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 19
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc 60

tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120

cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180

gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240

cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300

tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

<210> 20
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 20
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 Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
50 55 60

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

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

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105

<210> 21
<211> 336
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 21
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60

tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120

cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180

gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240

cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300

tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

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

<220>
<221> fuente<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 22
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 23
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucléotido sintético"

<400> 23
ggtggcggag gttctggagg tggaggttcc 30

<210> 24
<211> 150
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 24
Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
1 5 10 15

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

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
50 55 60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val
145 150

<210> 25
<211> 450
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 25
cccggatggt ttctggactc tccggatcgc ccgtggaatc ccccaacctt ctcaccggca 60

ctcttggttg tgactgaggg cgataatgcg accttcacgt gctcgttctc caacacctcc 120

gaatcattcg tgctgaactg gtaccgcatg agcccgtcaa accagaccga caagctcgcc 180

gcgtttccgg aagatcggtc gcaaccggga caggattgtc ggttccgcgt gactcaactg 240

ccgaatggca gagacttcca catgagcgtg gtccgcgcta ggcgaaacga ctccgggacc 300

tacctgtgcg gagccatctc gctggcgcct aaggcccaaa tcaaagagag cttgagggcc 360

gaactgagag tgaccgagcg cagagctgag gtgccaactg cacatccatc cccatcgcct 420

cggcctgcgg ggcagtttca gaccctggtc 450

<210> 26
<211> 390
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 26
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 Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro
            20                  25                  30

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

Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe
    50                  55                  60

Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu
65                  70                  75                  80

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

Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val
            100                 105                 110

Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser
        115                 120                 125

Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg
    130                 135                 140

Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser
145                 150                 155                 160

Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Thr Thr Thr Pro Ala
                165                 170                 175

Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
            180                 185                 190

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
        195                 200                 205

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
    210                 215                 220

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
225                 230                 235                 240

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
                245                 250                 255

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
            260                 265                 270

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
        275                 280                 285
```

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
290 295 300

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
305 310 315 320

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
325 330 335

Gln Glu Gly Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
340 345 350

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
355 360 365

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
370 375 380

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
385 390

<210> 27
<211> 1182
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 27
atggccctcc ctgtcactgc cctgcttctc cccctcgcac tcctgctcca cgccgctaga 60

ccacccggat ggtttctgga ctctccggat cgcccgtgga atcccccaac cttctcaccg 120

gcactcttgg ttgtgactga gggcgataat gcgaccttca cgtgctcgtt ctccaacacc 180

tccgaatcat tcgtgctgaa ctggtaccgc atgagcccgt caaaccagac cgacaagctc 240

gccgcgtttc cggaagatcg gtcgcaaccg ggacaggatt gtcggttccg cgtgactcaa 300

ctgccgaatg gcagagactt ccacatgagc gtggtccgcg ctaggcgaaa cgactccggg 360

acctacctgt gcggagccat ctcgctggcg cctaaggccc aaatcaaaga gagcttgagg 420

gccgaactga gagtgaccga gcgcagagct gaggtgccaa ctgcacatcc atccccatcg 480

cctcggcctg cggggcagtt tcagaccctg gtcacgacca ctccggcgcc gcgcccaccg 540

actccggccc caactatcgc gagccagccc ctgtcgctga ggccggaagc atgccgccct 600

gccgccggag gtgctgtgca tacccgggga ttggacttcg catgcgacat ctacatttgg 660

gctcctctcg ccggaacttg tggcgtgctc cttctgtccc tggtcatcac cctgtactgc 720

aagcggggtc ggaaaaagct tctgtacatt ttcaagcagc ccttcatgag gcccgtgcaa 780

accacccagg aggaggacgg ttgctcctgc cggttccccg aagaggaaga aggaggttgc 840

gagctgcgcg tgaagttctc ccggagcgcc gacgcccccg cctataagca gggccagaac 900

cagctgtaca acgaactgaa cctgggacgg cgggaagagt acgatgtgct ggacaagcgg 960

cgcggccggg accccgaaat gggcgggaag cctagaagaa agaaccctca ggaaggcctg 1020

tataacgagc tgcagaagga caagatggcc gaggcctact ccgaaattgg gatgaaggga 1080

gagcggcgga ggggaaaggg gcacgacggc ctgtaccaag gactgtccac cgccaccaag 1140

gacacatacg atgccctgca catgcaggcc cttccccctc gc 1182

<210> 28
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> /nota="Esta secuencia puede comprender 1-10 unidades de repetición 'Gly Gly Gly Ser', en la que algunas posiciones pueden estar ausentes"

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Véase la memoria tal como se presentó para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 28
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
35 40

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 29
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 30
<211> 15
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 30
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 31
Gly Gly Gly Ser
1

<210> 32
<211> 2000
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2000)
<223> /nota="Esta secuencia puede comprender 50-2.000 nucleótidos, en la que algunas posiciones pueden estar ausentes"

<400> 32
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 240

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 300

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 420

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 480

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 540

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 600

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 720

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 780

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 840

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 900

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 960

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1020

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1080

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1260

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1320

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1380

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1440

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1500

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1680

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1860

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1920

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1980

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2000

<210> 33
<211> 150
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 33
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 150

<210> 34
<211> 5000
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 34
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 240
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 300
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 420
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 480
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 540
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 600
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 720
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 780
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 840
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 900
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 960
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1020
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1080
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1260
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1320
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1380
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1440
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1500
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1680
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1860
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1920
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1980

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2040

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2100

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2160

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2220

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2280

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2340

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2400

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2460

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2520

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2580

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2640

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2700

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2760

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2820

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2880

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2940

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3000

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3060

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3120

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3180

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3240

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3300

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3360

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3420

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3480

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3540

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3600

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3660

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3720

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3780

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3840

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3900

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3960

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4020

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4080

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4140

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4200

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4260

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4320

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4380

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4440

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4500

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4560

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4620

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4680

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4740

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4800

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4860

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4920

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4980

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5000

<210> 35
<211> 100
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 35
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 60

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 100

<210> 36
<211> 500
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 36
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 60

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 120

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 180

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 240

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 300

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 360

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 420

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 480

tttttttttt tttttttttt 500

<210> 37
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucléotido sintético"

<400> 37
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaa 64

<210> 38
<211> 400
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(400)
<223> /nota="Esta secuencia puede comprender 100-400 nucleótidos, en la que algunas posiciones pueden estar ausentes"

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Véase la memoria tal como se presentó para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 38
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 240

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 300

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 400

<210> 39
<211> 369
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 39

```
Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
1               5                  10                  15

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

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
        35                  40                  45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
    50                  55                  60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
65                  70                  75                  80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
                85                  90                  95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
            100                 105                 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
        115                 120                 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
    130                 135                 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr
145                 150                 155                 160

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
                165                 170                 175

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe
            180                 185                 190

Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val
        195                 200                 205

Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys
    210                 215                 220

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr
225                 230                 235                 240

Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu
                245                 250                 255
```

Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
260 265 270

Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
275 280 285

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
290 295 300

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Asn Glu
305 310 315 320

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
325 330 335

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Gln Gly Leu Ser Thr
340 345 350

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
355 360 365

Arg

<210> 40
<211> 35
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40
Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr
1 5 10 15

Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp
20 25 30

Val Thr Leu
35

<210> 41
<211> 105
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 41
acaaaaaaga agtattcatc cagtgtgcac gaccctaacg gtgaatacat gttcatgaga 60

gcagtgaaca cagccaaaaa atccagactc acagatgtga cccta 105

<210> 42
<211> 69

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 42
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 Phe Trp Leu
35 40 45

Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile
50 55 60

Leu Ile Cys Trp Leu
65

<210> 43
<211> 207
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 43
accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg 60

tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcgggggcg cagtgcacac gagggggctg 120

gacttcgcct gtgatttctg gttacccata ggatgtgcag cctttgttgt agtctgcatt 180

ttgggatgca tacttatttg ttggctt 207

<210> 44
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 44
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 45
<211> 123
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 45
aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60

gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120

tcc 123

<210> 46
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 46
Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Phe
1 5 10 15

Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp
20 25 30

Val Thr Leu
35

<210> 47
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 47
Phe Met Phe Met
1

<210> 48
<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 48
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu
115 120 125

Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
130 135 140

Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg
145 150 155 160

Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser
165 170 175

Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser
180 185 190

Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr
195 200 205

Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly
210 215 220

Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
225 230 235 240

Ser Ser

<210> 49
<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 49
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu
115 120 125

Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
130 135 140

Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg
145 150 155 160

Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser
165 170 175

Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser
180 185 190

Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr
195 200 205

Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly
210 215 220

Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
225 230 235 240

Ser Ser

<210> 50
<211> 242

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 50

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

Ile Lys

<210> 51
<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 51

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

Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
225 230 235 240

Ile Lys

<210> 52
<211> 247
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 52
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
115 120 125

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
130 135 140

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
145 150 155 160

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
165 170 175

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys Ser
180 185 190

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
195 200 205

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
210 215 220

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 53
<211> 247
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 53
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
115 120 125

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
130 135 140

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
145 150 155 160

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
165 170 175

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser
180 185 190

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
195 200 205

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
210 215 220

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 54
<211> 247
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 54
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met
130 135 140

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
145 150 155 160

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr
165 170 175

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser
180 185 190

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
210 215 220

Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245

<210> 55
<211> 247
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 55
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met
130 135 140

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
145 150 155 160

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr
165 170 175

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser
180 185 190

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
210 215 220

Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245

<210> 56
<211> 247
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 56
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
115 120 125

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
130 135 140

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
145 150 155 160

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
165 170 175

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser
180 185 190

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
195 200 205

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
210 215 220

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 57
<211> 247
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 57
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met
130 135 140

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
145 150 155 160

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr
165 170 175

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser
180 185 190

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
210 215 220

Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245

<210> 58
<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 58
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu
115 120 125

Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
130 135 140

Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg
145 150 155 160

Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser
165 170 175

Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser
180 185 190

Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr
195 200 205

Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly
210 215 220

Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
225 230 235 240

Ser Ser

<210> 59
<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 59
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala
130 135 140

Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala
145 150 155 160

Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
165 170 175

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly
180 185 190

Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu
195 200 205

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln
210 215 220

Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
225 230 235 240

Ile Lys

<210> 60
<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 60

```
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 Gly Gly Gly Gly Ser
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu
        115                 120                 125

Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys
    130                 135                 140

Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg
145                 150                 155                 160

Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser
                165                 170                 175

Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile
            180                 185                 190

Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln
        195                 200                 205

Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly
    210                 215                 220

Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
225                 230                 235                 240

Ser Ser
```

<210> 61
<211> 244
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 61

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Asn Thr Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ile
115 120 125

Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val
130 135 140

Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr Gly Met
145 150 155 160

Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Ser Phe Lys Trp Met Gly Trp
165 170 175

Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Lys Gly
180 185 190

Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu His
195 200 205

Ile Asn Asp Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
210 215 220

Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
225 230 235 240

Thr Val Ser Ser

<210> 62
<211> 237
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 62

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

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
225 230 235

<210> 63
<211> 249
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 63
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Asn Thr Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 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 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys
130 135 140

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe
145 150 155 160

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

Ala Asp Phe Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser
195 200 205

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Ala Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp Tyr Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 64
<211> 249
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 64
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Asn Thr Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 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 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
130 135 140

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe
145 150 155 160

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
165 170 175

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

Ala Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Leu Asp Thr Ser Ala Ser
195 200 205

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp Tyr Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 65
<211> 249
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 65
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Asn Thr Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 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 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys
130 135 140

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe
145 150 155 160

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

Ala Asp Phe Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser
195 200 205

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Ala Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp Tyr Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 66
<211> 249
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 66
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Asn Thr Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 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 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
130 135 140

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe
145 150 155 160

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
165 170 175

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

Ala Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Leu Asp Thr Ser Ala Ser
195 200 205

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp Tyr Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 67
<211> 249
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 67
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ser Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Ala Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln
130 135 140

Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn
145 150 155 160

Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Asn Thr Phe Met His
165 170 175

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg
180 185 190

Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp
210 215 220

Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245

<210> 68
<211> 249
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 68
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ser Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Ala Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln
130 135 140

Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
145 150 155 160

Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Asn Thr Phe Met His
165 170 175

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg
180 185 190

Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp
210 215 220

Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245

<210> 69
<211> 249
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 69
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ser Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln
130 135 140

Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn
145 150 155 160

Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Asn Thr Phe Met His
165 170 175

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg
180 185 190

Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp
210 215 220

Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245

<210> 70
<211> 249
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 70
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ser Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln
130 135 140

Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
145 150 155 160

Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Asn Thr Phe Met His
165 170 175

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg
180 185 190

Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp
210 215 220

Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245

<210> 71
<211> 246
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 71
Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser
130 135 140

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

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln
165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys
180 185 190

Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
195 200 205

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

Thr Lys Val Glu Ile Lys
245

<210> 72
<211> 246
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 72

```
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
            20                  25                  30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
        35                  40                  45

Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65                  70                  75                  80

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

Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
    130                 135                 140

Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn
145                 150                 155                 160

Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly
                165                 170                 175

Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr
            180                 185                 190

Gly Pro Ile Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
        195                 200                 205

Asn Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
    210                 215                 220

Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225                 230                 235                 240

Thr Val Thr Val Ser Ser
                245
```

<210> 73
<211> 246
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 73

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe
50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser
130 135 140

Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser
145 150 155 160

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln
165 170 175

Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys
180 185 190

Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
195 200 205

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

Thr Lys Val Glu Ile Lys
245

<210> 74
<211> 246
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 74

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

Met Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Thr Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 75
<211> 246
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 75
Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser
130 135 140

Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser
145 150 155 160

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln
165 170 175

Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys
180 185 190

Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
195 200 205

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

Thr Lys Val Glu Ile Lys
245

<210> 76
<211> 246
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 76
Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe
50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser
130 135 140

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

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln
165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys
180 185 190

Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
195 200 205

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

Thr Lys Val Glu Ile Lys
245

<210> 77
<211> 246
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 77
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

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

Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
130 135 140

Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn
145 150 155 160

Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly
165 170 175

Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr
180 185 190

Gly Pro Ile Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Ile
195 200 205

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala
210 215 220

Met Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Thr Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 78
<211> 246
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 78
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

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

Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
130 135 140

Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn
145 150 155 160

Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly
165 170 175

Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr
180 185 190

Gly Pro Ile Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
195 200 205

Asn Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Thr Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 79
<211> 243
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 79
Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe
50 55 60

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

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser His Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val
130 135 140

Ala Ile Gly Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
145 150 155 160

Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
165 170 175

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

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
195 200 205

Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
210 215 220

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240

Glu Ile Lys

<210> 80
<211> 239
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 80
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
130 135 140

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
145 150 155 160

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
165 170 175

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

Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
195 200 205

Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
210 215 220

Ser Gly Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile
225 230 235

<210> 81
<211> 256
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 81
Ser Arg Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
1 5 10 15

Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Leu Ile Ser Cys Lys
20 25 30

Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Phe Met Asn Trp Val Lys Gln
35 40 45

Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp
50 55 60

Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
65 70 75 80

Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr
85 90 95

Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg
100 105 110

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
130 135 140

Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg
145 150 155 160

Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr
165 170 175

Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro Lys Leu
180 185 190

Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Thr Arg Phe
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val
210 215 220

Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Glu Tyr
225 230 235 240

Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala
245 250 255

<210> 82
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 82
Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys
85 90 95

Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
115

<210> 83
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 83
Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Cys Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro
85 90 95

Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Arg Ser
100 105 110

<210> 84
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 84
Arg Gly Asp Ser
1

<210> 85
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 85
Tyr Met Phe Met
1

<210> 86
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 86
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 87
<211> 5000
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(5000)
<223> /nota="Esta secuencia puede comprender 50-5.000 nucleótidos, en la que algunas posiciones pueden estar ausentes"

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Véase la memoria tal como se presentó para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 87
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 60

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 120

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 180

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 240

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 300

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 360

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 420

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 480

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 540

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 600

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 660

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 720

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 780

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 840

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 900

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 960

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1020

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1080

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1140

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1200

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1260

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1320

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1380

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1440

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1500

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1560

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1620

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1680

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1740

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1800

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1860

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1920

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1980

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2040

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2100

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2160

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2220

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2280

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2340

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2400

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2460

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2520

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2580

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2640

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2700

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2760

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2820

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2880

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2940

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3000

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3060

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3120

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3180

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3240

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3300

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3360

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3420

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3480

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3540

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3600

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3660

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3720

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3780

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3840

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3900

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3960

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4020

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4080

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4140

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4200

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4260

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4320

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4380

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4440

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4500

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4560

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4620

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4680

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4740

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4800

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4860

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4920

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4980

tttttttttt tttttttttt 5000

<210> 88
<211> 5000
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(5000)
<223> /nota="Esta secuencia puede comprender 100-5.000 nucleótidos, en la que algunas posiciones pueden estar ausentes"

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Véase la memoria tal como se presentó para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 88
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 240

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 300

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 420

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 480

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 540

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 600

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 720

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 780

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 840

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 900

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 960

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1020

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1080

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1260

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1320

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1380

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1440

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1500

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1680

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1860

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1920

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1980

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2040

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2100

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2160

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2220

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2280

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2340

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2400

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2460

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2520

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2580

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2640

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2700

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2760

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2820

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2880

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2940

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3000

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3060

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3120

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3180

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3240

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3300

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3360

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3420

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3480

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3540

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3600

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3660

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3720

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3780

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3840

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3900

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3960

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4020

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4080

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4140

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4200

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4260

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4320

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4380

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4440

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4500

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4560

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4620

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4680

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4740

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4800

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4860

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4920

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4980

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5000

<210> 89
<211> 486
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 89

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	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			

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu
	130					135					140				

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

Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly
			165					170					175		

Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly
			180					185					190		

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

```
Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
    210                 215                 220

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys
225                 230                 235                 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
                245                 250                 255

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
            260                 265                 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
        275                 280                 285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
    290                 295                 300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
305                 310                 315                 320

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
                325                 330                 335

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
            340                 345                 350

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
        355                 360                 365

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
    370                 375                 380

Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
385                 390                 395                 400

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
                405                 410                 415

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
            420                 425                 430

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
        435                 440                 445

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
    450                 455                 460

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
465                 470                 475                 480
```

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485

<210> 90
<211> 132
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 90
Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Gly Pro Ser Ser Pro Lys Lys
1 5 10 15

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

Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr
35 40 45

Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg
50 55 60

Asn Lys Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly
65 70 75 80

Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile
100 105 110

Ile Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu
115 120 125

Glu Thr Ser Tyr
130

<210> 91
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 91
Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys
1 5 10 15

Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly
20 25 30

Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe Met
35 40 45

Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln
50 55 60

Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Ala
65 70 75 80

Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr Leu
85 90 95

Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Thr Ser
100 105

<210> 92
<211> 93
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92
Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg
1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu
20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr
35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp
50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Thr Gln Ala
65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys
85 90

<210> 93
<211> 95
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 93
Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Ile Glu Ala Ser Arg
1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu
20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr
35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp
50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Thr Gln Ala
65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser
85 90 95

<210> 94
<211> 95
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 94
Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Leu Glu Ala Ser Arg
1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu
20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr
35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp
50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Thr Gln Ala
65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser
85 90 95

<210> 95
<211> 95
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 95
Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg
1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu
20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr
35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp
50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala
65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser
85 90 95

<210> 96
<211> 95
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (78)..(78)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 96
Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Xaa Glu Ala Ser Arg
1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu
20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr
35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp
50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Xaa Gln Ala
65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser
85 90 95

<210> 97
<211> 95
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 97
Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Ile Glu Ala Ser Arg
1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu
20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr
35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp
50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala
65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser
85 90 95

<210> 98
<211> 95
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 98
Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Leu Glu Ala Ser Arg
1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu
20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr
35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp
50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala
65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser
85 90 95

<210> 99
<211> 521
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 99
acccctctct ccagccacta agccagttgc tccctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60

ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgtccc gggtgtgatg gcggggtgtg 120

gggcggaggg cgtggcgggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc 180

gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac gagggaccgc gacaggcaga 240

cgctcccatg atcactctgc acgccgaagg caaatagtgc aggccgtgcg gcgcttggcg 300

ttccttggaa gggctgaatc cccgcctcgt ccttcgcagc ggccccccgg gtgttcccat 360

cgccgcttct aggcccactg cgacgcttgc ctgcacttct tacacgctct gggtcccagc 420

cgcggcgacg caaagggcct tggtgcgggt ctcgtcggcg cagggacgcg tttgggtccc 480

gacggaacct tttccgcgtt ggggttgggg caccataagc t 521

<210> 100
<211> 118
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 100
acccctctct ccagccacta agccagttgc tccctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60

ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgtccc gggtgtgatg gcggggtg 118

<210> 101
<211> 221
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 101
acccctctct ccagccacta agccagttgc tccctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60

ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgtccc gggtgtgatg gcggggtgtg 120

gggcggaggg cgtggcgggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc 180

gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac g 221

<210> 102
<211> 324
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 102
acccctctct ccagccacta agccagttgc tccctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60

ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgtccc gggtgtgatg gcggggtgtg 120

gggcggaggg cgtggcgggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc 180

gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac gagggaccgc gacaggcaga 240

cgctcccatg atcactctgc acgccgaagg caaatagtgc aggccgtgcg gcgcttggcg 300

ttccttggaa gggctgaatc cccg 324

<210> 103
<211> 422
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 103
acccctctct ccagccacta agccagttgc tccctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60

ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgtccc gggtgtgatg gcggggtgtg 120

gggcggaggg cgtggcgggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc 180

gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac gagggaccgc gacaggcaga 240

cgctcccatg atcactctgc acgccgaagg caaatagtgc aggccgtgcg gcgcttggcg 300

ttccttggaa gggctgaatc cccgcctcgt ccttcgcagc ggccccccgg gtgttcccat 360

cgccgcttct aggcccactg cgacgcttgc ctgcacttct tacacgctct gggtcccagc 420

cg 422

<210> 104
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 104
Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu
1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Pro
20

<210> 105
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 105
Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro
20

<210> 106

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 106
Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
1 5 10 15

Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20

<210> 107
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 107
Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20 25

<210> 108
<211> 1132
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 108
Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
1 5 10 15

His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
20 25 30

Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
35 40 45

Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
50 55 60

Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu
65 70 75 80

Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val
85 90 95

Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro
100 105 110

Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr

115 120 125

Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val
130 135 140

Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val
145 150 155 160

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

Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly
180 185 190

Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg
195 200 205

Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg
210 215 220

Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg
225 230 235 240

Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp
245 250 255

Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val
260 265 270

Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala
275 280 285

Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His
290 295 300

Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro
305 310 315 320

Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly
325 330 335

Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro
340 345 350

Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser
355 360 365

Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln
370 375 380

Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His

385 390 395 400

Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg
405 410 415

Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln
420 425 430

Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu
435 440 445

Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe
450 455 460

Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser
465 470 475 480

Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser
485 490 495

Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met
500 505 510

Ser Val Arg Gly Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys
515 520 525

Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe
530 535 540

Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe
545 550 555 560

Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr
565 570 575

Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His
580 585 590

Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln
595 600 605

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
610 615 620

Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val
625 630 635 640

Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser
645 650 655

Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg

660 665 670

Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg
675 680 685

Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro
690 695 700

Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile
705 710 715 720

Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln
725 730 735

Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His
740 745 750

Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp
755 760 765

Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser
770 775 780

Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu
785 790 795 800

Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His
805 810 815

Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro
820 825 830

Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp
835 840 845

Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu
850 855 860

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala
865 870 875 880

Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys
885 890 895

Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu
900 905 910

Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe
915 920 925

Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser

930 935 940

Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe
945 950 955 960

Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly
965 970 975

Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn
980 985 990

Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln
995 1000 1005

Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln
1010 1015 1020

Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp
1025 1030 1035

Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly
1040 1045 1050

Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu
1055 1060 1065

Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr
1070 1075 1080

Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr
1085 1090 1095

Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr
1100 1105 1110

Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys
1115 1120 1125

Thr Ile Leu Asp
1130

<210> 109
<211> 4027
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 109
caggcagcgt ggtcctgctg cgcacgtggg aagccctggc cccggccacc cccgcgatgc 60

cgcgcgctcc ccgctgccga gccgtgcgct ccctgctgcg cagccactac cgcgaggtgc 120

tgccgctggc cacgttcgtg cggcgcctgg ggccccaggg ctggcggctg gtgcagcgcg 180

gggacccggc ggctttccgc gcgctggtgg cccagtgcct ggtgtgcgtg ccctgggacg 240

cacggccgcc ccccgccgcc ccctccttcc gccaggtgtc ctgcctgaag gagctggtgg 300

cccgagtgct gcagaggctg tgcgagcgcg gcgcgaagaa cgtgctggcc ttcggcttcg 360

cgctgctgga cggggcccgc gggggccccc ccgaggcctt caccaccagc gtgcgcagct 420

acctgcccaa cacggtgacc gacgcactgc gggggagcgg ggcgtggggg ctgctgttgc 480

gccgcgtggg cgacgacgtg ctggttcacc tgctggcacg ctgcgcgctc tttgtgctgg 540

tggctcccag ctgcgcctac caggtgtgcg ggccgccgct gtaccagctc ggcgctgcca 600

ctcaggcccg gcccccgcca cacgctagtg gaccccgaag gcgtctggga tgcgaacggg 660

cctggaacca tagcgtcagg gaggccgggg tccccctggg cctgccagcc ccgggtgcga 720

ggaggcgcgg gggcagtgcc agccgaagtc tgccgttgcc caagaggccc aggcgtggcg 780

ctgcccctga gccggagcgg acgcccgttg ggcaggggtc ctgggcccac ccgggcagga 840

cgcgtggacc gagtgaccgt ggtttctgtg tggtgtcacc tgccagaccc gccgaagaag 900

ccacctcttt ggagggtgcg ctctctggca cgcgccactc ccacccatcc gtgggccgcc 960

agcaccacgc gggcccccca tccacatcgc ggccaccacg tccctgggac acgccttgtc 1020

ccccggtgta cgccgagacc aagcacttcc tctactcctc aggcgacaag gagcagctgc 1080

ggccctcctt cctactcagc tctctgaggc ccagcctgac tggcgctcgg aggctcgtgg 1140

agaccatctt tctgggttcc aggccctgga tgccagggac tccccgcagg ttgccccgcc 1200

tgccccagcg ctactggcaa atgcggcccc tgtttctgga gctgcttggg aaccacgcgc 1260

agtgccccta cggggtgctc ctcaagacgc actgcccgct gcgagctgcg gtcaccccag 1320

cagccggtgt ctgtgcccgg gagaagcccc agggctctgt ggcggccccc gaggaggagg 1380

acacagaccc ccgtcgcctg gtgcagctgc tccgccagca cagcagcccc tggcaggtgt 1440

acggcttcgt gcgggcctgc ctgcgccggc tggtgccccc aggcctctgg ggctccaggc 1500

acaacgaacg ccgcttcctc aggaacacca agaagttcat ctccctgggg aagcatgcca 1560

agctctcgct gcaggagctg acgtggaaga tgagcgtgcg gggctgcgct tggctgcgca 1620

ggagcccagg ggttggctgt gttccggccg cagagcaccg tctgcgtgag gagatcctgg 1680

ccaagttcct gcactggctg atgagtgtgt acgtcgtcga gctgctcagg tctttctttt 1740

atgtcacgga gaccacgttt caaaagaaca ggctcttttt ctaccggaag agtgtctgga 1800

gcaagttgca aagcattgga atcagacagc acttgaagag ggtgcagctg cgggagctgt 1860

cggaagcaga ggtcaggcag catcgggaag ccaggcccgc cctgctgacg tccagactcc 1920

gcttcatccc caagcctgac gggctgcggc cgattgtgaa catggactac gtcgtgggag 1980

ccagaacgtt ccgcagagaa aagagggccg agcgtctcac ctcgagggtg aaggcactgt 2040

tcagcgtgct caactacgag cgggcgcggc gccccggcct cctgggcgcc tctgtgctgg 2100

gcctggacga tatccacagg gcctggcgca ccttcgtgct gcgtgtgcgg gcccaggacc 2160

cgccgcctga gctgtacttt gtcaaggtgg atgtgacggg cgcgtacgac accatccccc 2220

aggacaggct cacggaggtc atcgccagca tcatcaaacc ccagaacacg tactgcgtgc 2280

gtcggtatgc cgtggtccag aaggccgccc atgggcacgt ccgcaaggcc ttcaagagcc 2340

acgtctctac cttgacagac ctccagccgt acatgcgaca gttcgtggct cacctgcagg 2400

agaccagccc gctgagggat gccgtcgtca tcgagcagag ctcctccctg aatgaggcca 2460

gcagtggcct cttcgacgtc ttcctacgct tcatgtgcca ccacgccgtg cgcatcaggg 2520

gcaagtccta cgtccagtgc caggggatcc cgcagggctc catcctctcc acgctgctct 2580

gcagcctgtg ctacggcgac atggagaaca agctgtttgc ggggattcgg cgggacgggc 2640

tgctcctgcg tttggtggat gatttcttgt tggtgacacc tcacctcacc cacgcgaaaa 2700

ccttcctcag gaccctggtc cgaggtgtcc ctgagtatgg ctgcgtggtg aacttgcgga 2760

agacagtggt gaacttccct gtagaagacg aggccctggg tggcacggct tttgttcaga 2820

tgccggccca cggcctattc ccctggtgcg gcctgctgct ggatacccgg accctggagg 2880

tgcagagcga ctactccagc tatgcccgga cctccatcag agccagtctc accttcaacc 2940

gcggcttcaa ggctgggagg aacatgcgtc gcaaactctt tggggtcttg cggctgaagt 3000

gtcacagcct gtttctggat ttgcaggtga acagcctcca gacggtgtgc accaacatct 3060

acaagatcct cctgctgcag gcgtacaggt ttcacgcatg tgtgctgcag ctcccatttc 3120

atcagcaagt ttggaagaac cccacatttt tcctgcgcgt catctctgac acggcctccc 3180

tctgctactc catcctgaaa gccaagaacg cagggatgtc gctgggggcc aagggcgccg 3240

ccggccctct gccctccgag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcattc ctgctcaagc 3300

tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tcctggggtc actcaggaca gcccagacgc 3360

agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgccct ggaggccgca gccaacccgg 3420

cactgccctc agacttcaag accatcctgg actgatggcc acccgcccac agccaggccg 3480

agagcagaca ccagcagccc tgtcacgccg ggctctacgt cccagggagg gaggggcggc 3540

ccacacccag gcccgcaccg ctgggagtct gaggcctgag tgagtgtttg gccgaggcct 3600

gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaagggc 3660

tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttcact tccccacagg ctggcgctcg gctccacccc 3720

agggccagct tttcctcacc aggagcccgg cttccactcc ccacatagga atagtccatc 3780

cccagattcg ccattgttca cccctcgccc tgccctcctt tgccttccac ccccaccatc 3840

caggtggaga ccctgagaag gaccctggga gctctgggaa tttggagtga ccaaaggtgt 3900

gccctgtaca caggcgagga ccctgcacct ggatgggggt ccctgtgggt caaattgggg 3960

ggaggtgctg tgggagtaaa atactgaata tatgagtttt tcagttttga aaaaaaaaaa 4020

aaaaaaa 4027

REIVINDICACIONES

1. Composición o conjunto de composiciones que comprenden los siguientes componentes:
1) una célula T CD4+ que comprende un CAR (el CAR^{CD4+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular; y
2) una célula T CD8+ que comprende un CAR (el CAR^{CD8+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular; y,
en la que el dominio de señalización intracelular de CAR^{CD4+} y el dominio de señalización intracelular de CAR^{CD8+} difieren entre sí, en la que además el CAR^{CD4+} comprende un dominio ICOS.

2. Composición o conjunto de composiciones, según la reivindicación 1, en la que el CAR^{CD8+} no comprende un dominio ICOS.

3. Composición o conjunto de composiciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además:
3) una segunda célula T CD8+ que comprende un CAR (el segundo CAR^{CD8+}) que comprende:
un dominio de unión a antígeno;
un dominio transmembrana; y
un dominio de señalización intracelular,
en la que el segundo CAR^{CD8+} se diferencia del CAR^{CD4+} y el CAR^{CD8+}, y
en la que el segundo CAR^{CD8+} no comprende un dominio de señalización ICOS y comprende un dominio de señalización intracelular no presente en el CAR^{CD8+}.

4. Composición o conjunto de composiciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que es una composición farmacéuticamente aceptable o un conjunto de composiciones farmacéuticamente aceptables.

5. Composición o conjunto de composiciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el CAR^{CD4+} no incluye un dominio 4-1BB, un dominio CD28 y/o un dominio coestimulador distinto del dominio ICOS.

6. Composición o conjunto de composiciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el CAR^{CD4+} comprende un dominio de señalización intracelular primaria, que es opcionalmente un dominio de señal primaria de FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 zeta, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD66d, DAP10, DAP12 o CD32, opcionalmente en la que el dominio de señal primaria es un dominio CD3zeta.

7. Composición o conjunto de composiciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el CAR^{CD4+} comprende un segundo dominio coestimulador de señalización, que es opcionalmente de CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS (CD278), ICAM-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83, CDS, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMf7, NKP80 (KLRF1), CD160 (BY55), CD19, CD4, CD8 alfa, CD8 beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, C49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (C244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), PSGL1, C100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, o PAG/Cbp.

8. Composición o conjunto de composiciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el CAR^{CD8+} comprende:
un dominio de señalización intracelular primaria que es opcionalmente un dominio de la señal primaria de FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 zeta, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD66d, DAP10, DAP12 o CD32, por ejemplo, en el que el dominio de señal primaria es un dominio CD3zeta, y
un dominio coestimulador de señalización distinto de ICOS que es opcionalmente de CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS (CD278), ICAM-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83, CDS, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMf7, NKP80 (KLRF1), CD160 (BY55), CD19, CD4, CD8 alfa, CD8 beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, C49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (C244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), PSGL1, C100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, o PAG/Cbp, por ejemplo, en el que el dominio coestimulador de señalización distinto de ICOS es de 4-1BB o CD28.

9. Composición o conjunto de composiciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el CAR^{CD8+} comprende un segundo dominio coestimulador de señalización que es opcionalmente de CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS (CD278), ICAM-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se

une específicamente con CD83, CDS, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMf7, NKP80 (KLRF1), CD160 (BY55), CD19, CD4, CD8 alfa, CD8 beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, C49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (C244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), PSGL1, C100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, o PAG/Cbp.

10. Composición o conjunto de composiciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que
(1) al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, o 80% de las células T en la composición son células T CD4+ que comprenden un CAR^{CD4+}; y/o
(2) al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, o 80% de las células T en la composición son células T CD8+ que comprenden un CAR^{CD8+}.

11. Composición o conjunto de composiciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la célula CD4+ es una célula polarizada por Thl7.

12. Composición o conjunto de composiciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que el CAR^{CD4+} y el CAR^{CD8+} cada uno comprende un dominio variable de anticuerpo, un scFv, un nanocuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

13. Composición, o conjunto de composiciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que el CAR^{CD4+} y el CAR^{CD8+} comprende cada uno un dominio de unión a antígeno que:
(1) es específico para un antígeno tumoral seleccionado de CD19, CD20, CD22 , ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3, y cualquier combinación de los mismos; o
(2) se une a un antígeno seleccionado de entre CD19, CD123, EGFRvIII, mesotelina o receptor α de folato.

14. Composición o conjunto de composiciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el CAR^{CD4+} y el CAR^{CD8+} cada uno comprende un dominio de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos elegida de entre las SEQ ID NOs: 48-81.

15. Composición o conjunto de composiciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el CAR^{CD4+} comprende un dominio ICOS que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 40.

16. Kit que comprende:
(1) la composición o conjunto de composiciones según cualquiera de las reivindicaciones 1-15; o
(2) los siguientes componentes:
(a) un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un CAR^{CD4+}; y
(b) un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un CAR^{CD8+};
en el que dicho CAR^{CD4+} y CAR^{CD8+} son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1-15.

17. Composición o conjunto de composiciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, o el kit de la reivindicación 16, para usar en el tratamiento del cáncer.

18. Composición, conjunto de composiciones o kit, para usar, según la reivindicación 17, en la que
(i) la célula T $CD4^+$ que comprende el CAR^{CD4+} es una célula T autóloga o una célula T alogénica; y/o
(ii) la célula T $CD8^+$ que comprende el CAR^{CD8+} es una célula T autóloga o una célula T alogénica.

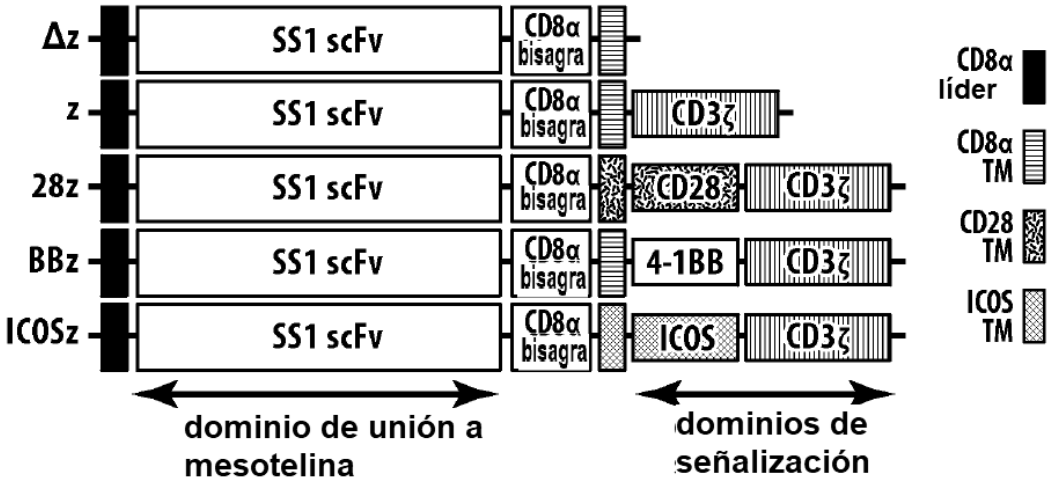

Δz
z
28z
BBz
ICOSz
SS1 scFv
CD8α bisagra
CD3ζ
CD28
4-1BB
ICOS
CD8α líder
CD8α TM
CD28 TM
ICOS TM
dominio de unión a mesotelina
dominios de señalización

Fig. 1A

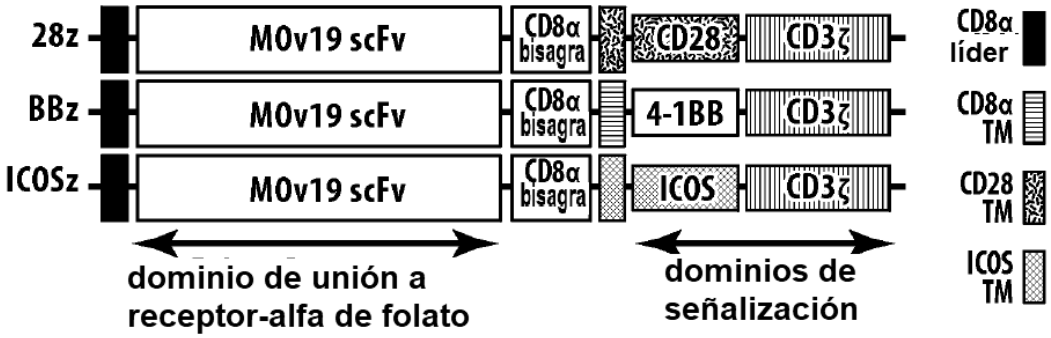

28z
BBz
ICOSz
M0v19 scFv
CD8α bisagra
CD28
CD3ζ
4-1BB
ICOS
CD8α líder
CD8α TM
CD28 TM
ICOS TM
dominio de unión a receptor-alfa de folato
dominios de señalización

Fig. 1B

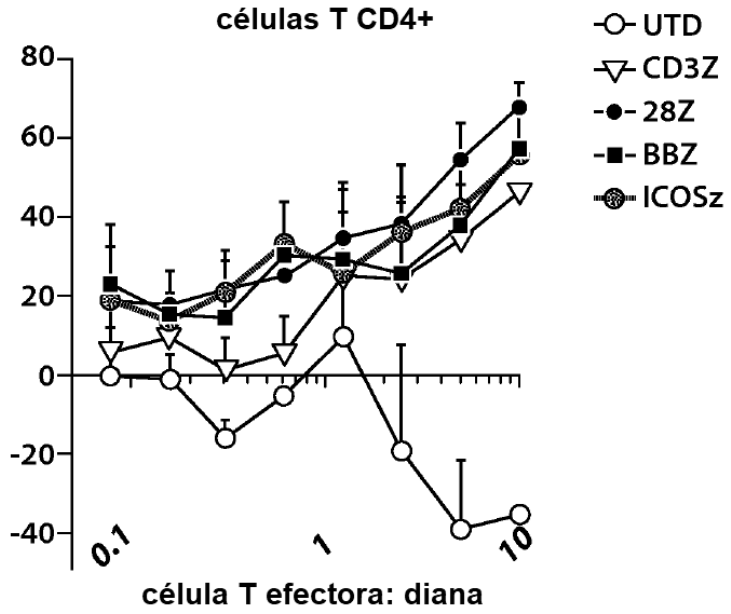

células T CD4+
UTD
CD3Z
28Z
BBZ
ICOSz
80
60
40
20
0
-20
-40
0.1
1
10
célula T efectora: diana

Fig. 2A

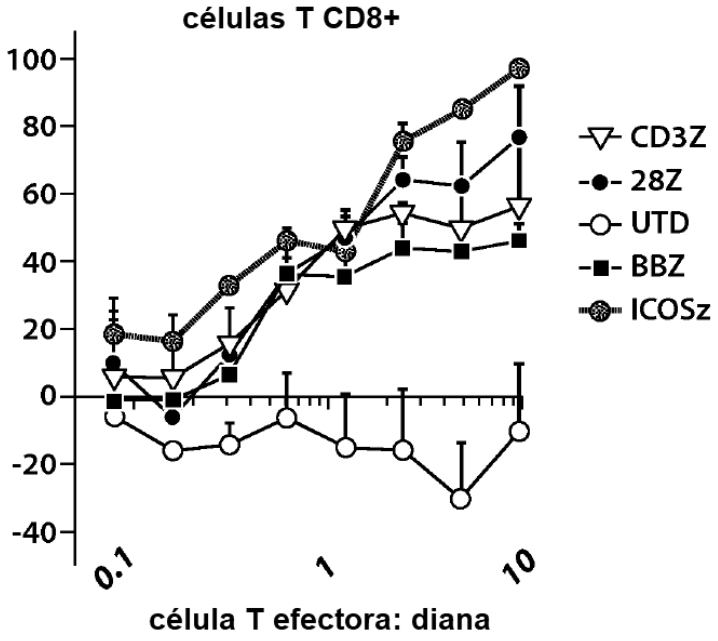

células T CD8+
CD3Z
28Z
UTD
BBZ
ICOSz
100
80
60
40
20
0
-20
-40
0.1
1
10
célula T efectora: diana

Fig. 2B

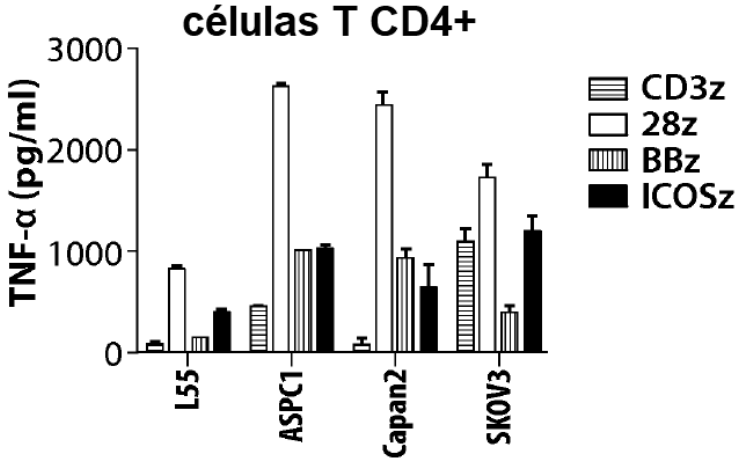


Fig. 3A

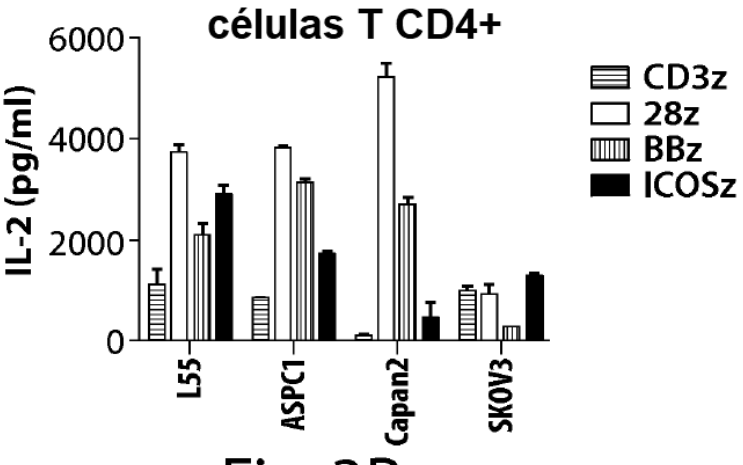


Fig. 3B

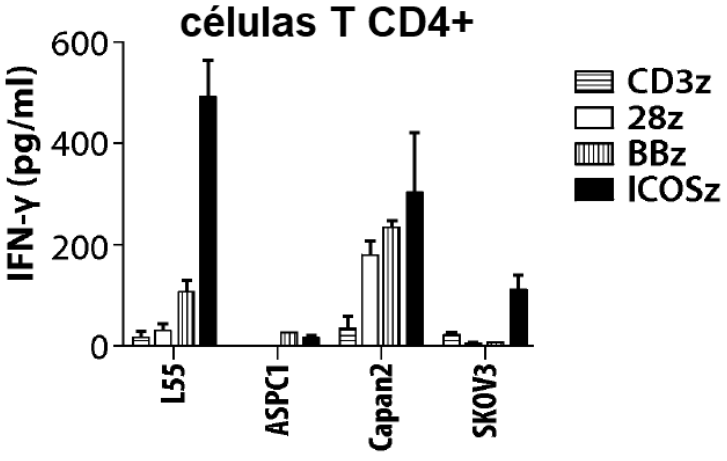


Fig. 3C

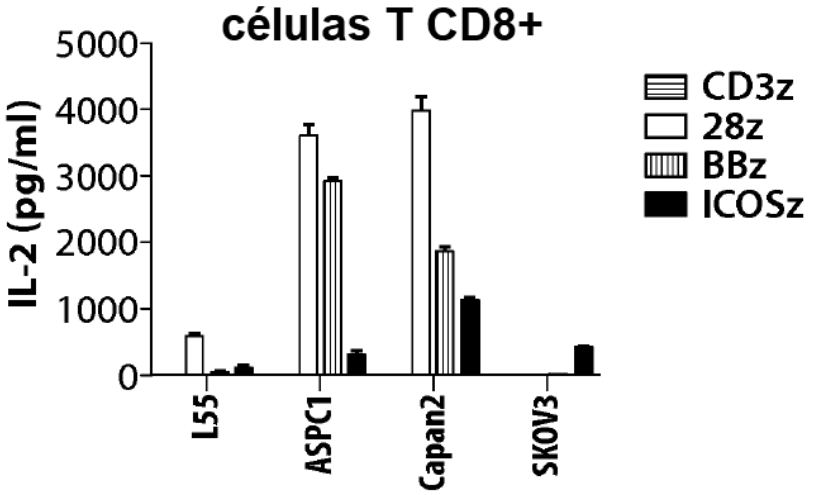

células T CD8+
IL-2 (pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
L55
ASPC1
Capan2
SKOV3
CD3z
28z
BBz
ICOSz

Fig. 3D

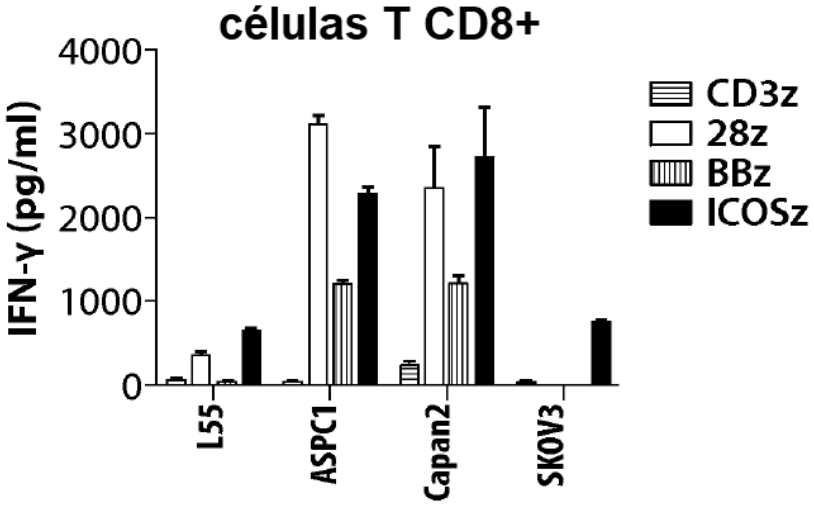

células T CD8+
IFN-γ (pg/ml)
4000
3000
2000
1000
0
L55
ASPC1
Capan2
SKOV3
CD3z
28z
BBz
ICOSz

Fig. 3E

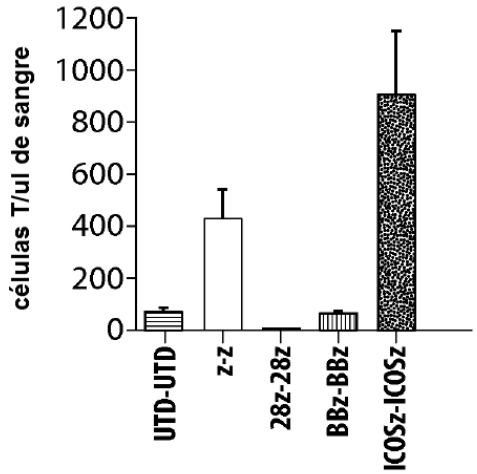


Fig. 4A

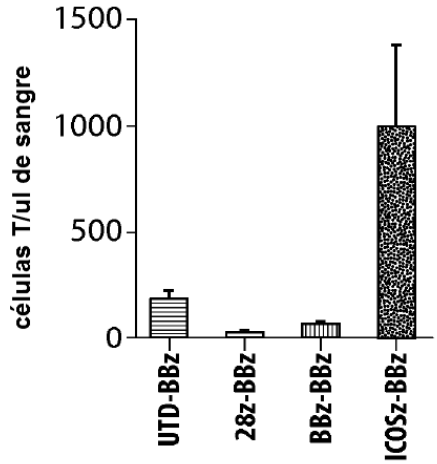


Fig. 4B

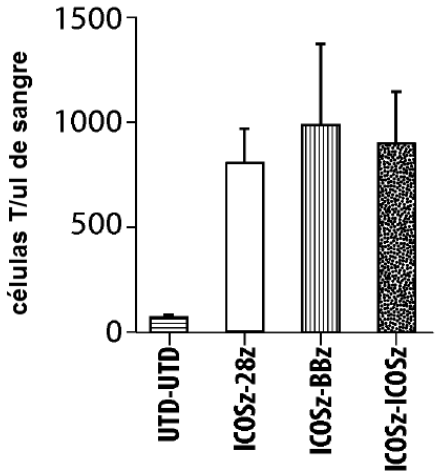


Fig. 4C

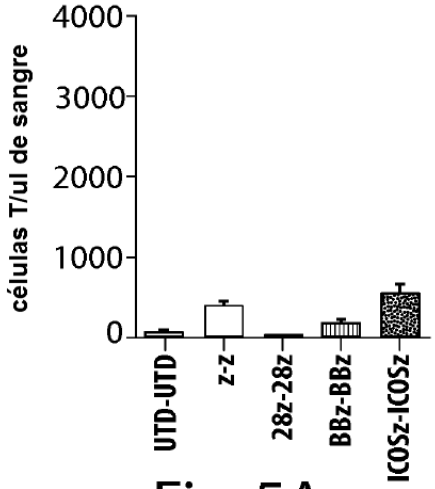


Fig. 5A

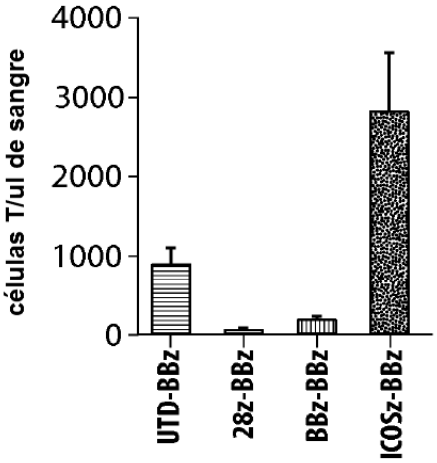


Fig. 5B

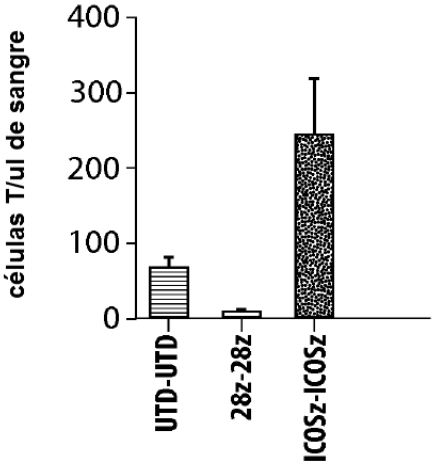


Fig. 5C

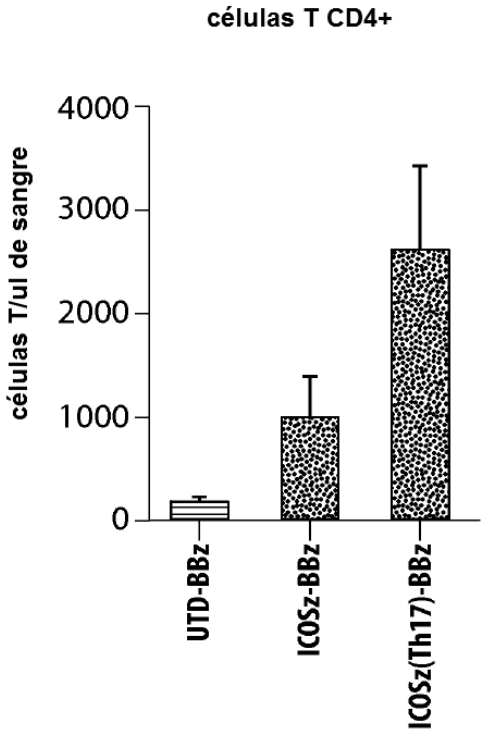

células T CD4+
células T/ul de sangre
4000
3000
2000
1000
0
UTD-BBz
ICOSz-BBz
ICOSz(Th17)-BBz

Fig. 6A

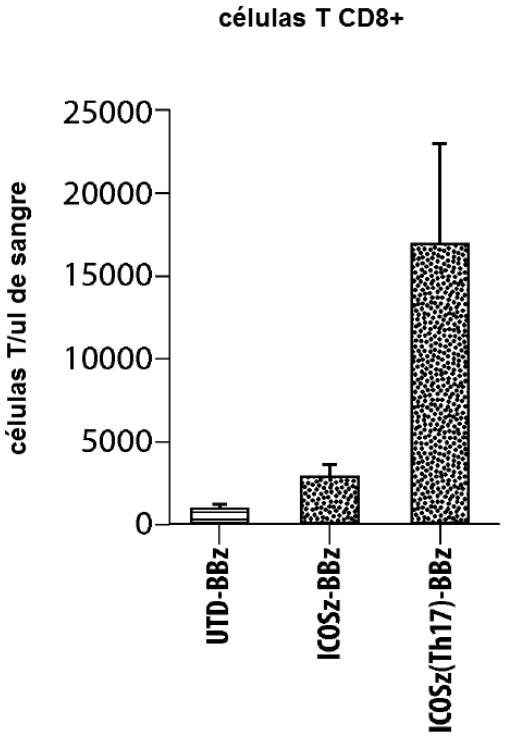

células T CD8+
células T/ul de sangre
25000
20000
15000
10000
5000
0
UTD-BBz
ICOSz-BBz
ICOSz(Th17)-BBz

Fig. 6B

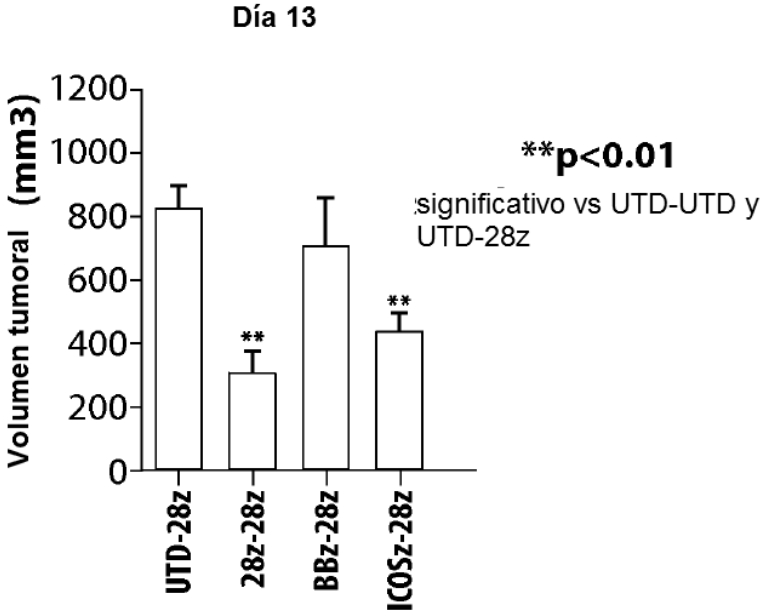

Día 13
Volumen tumoral (mm3)
1200
1000
800
600
400
200
0
**p<0.01
significativo vs UTD-UTD y
UTD-28z
**
**
UTD-28z
28z-28z
BBz-28z
ICOSz-28z

Fig. 7

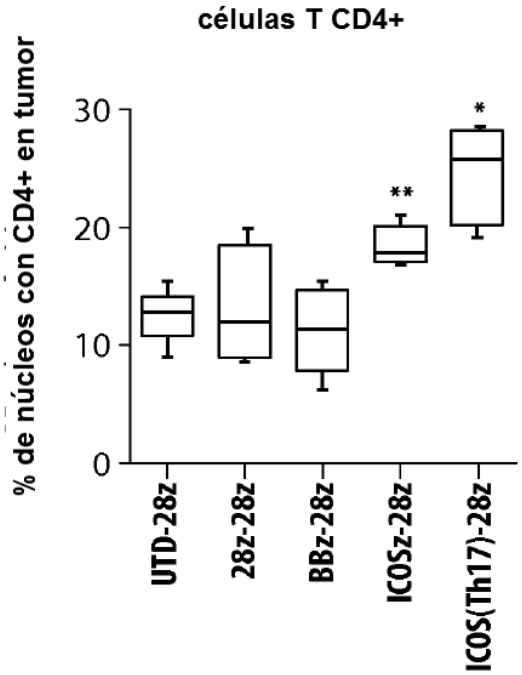

células T CD4+
% de núcleos con CD4+ en tumor
30
20
10
0
**
*
UTD-28z
28z-28z
BBz-28z
ICOSz-28z
ICOS(Th17)-28z

Fig. 8

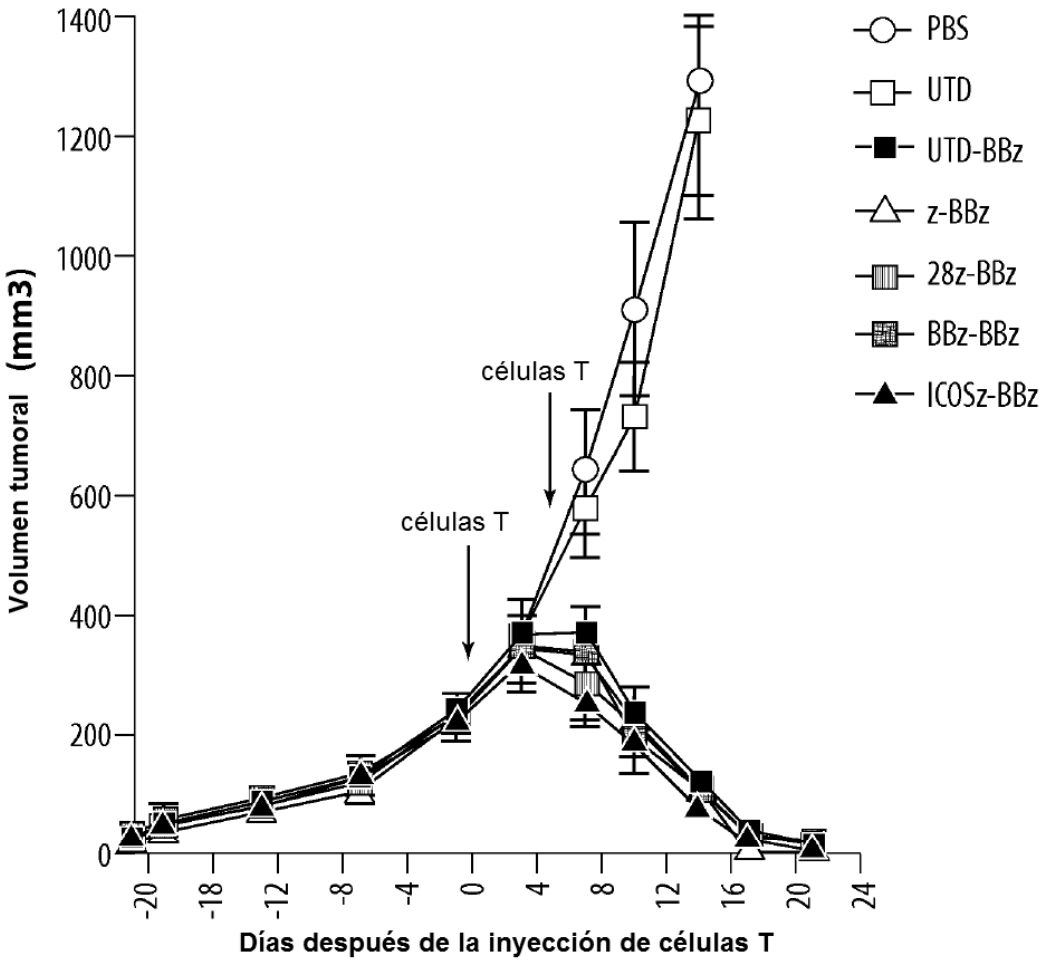


Fig. 9A

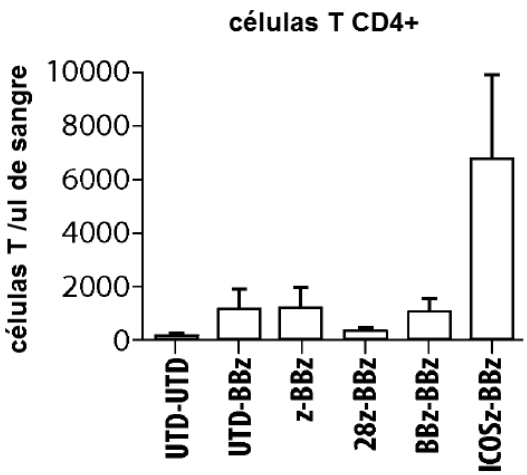


Fig. 9B

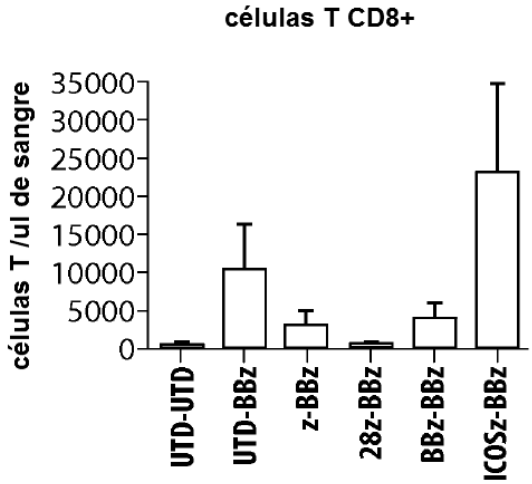


Fig. 9C

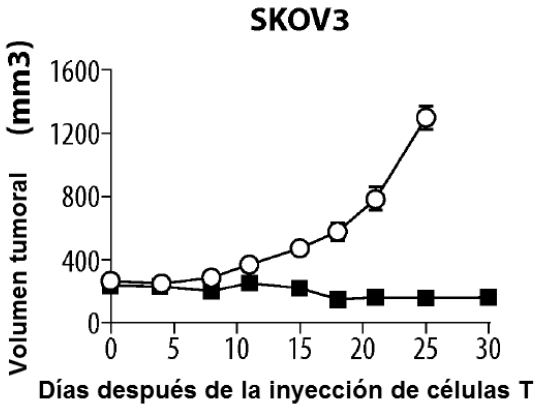


Fig. 10A

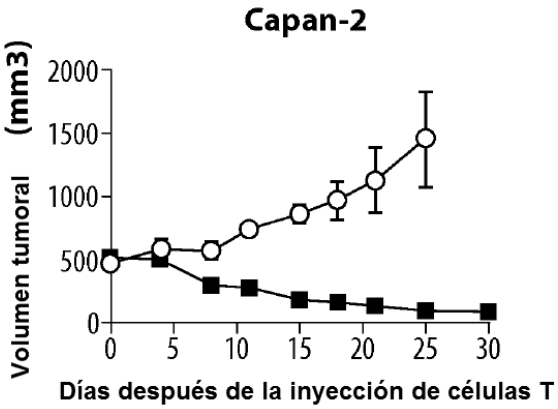


Fig. 10B

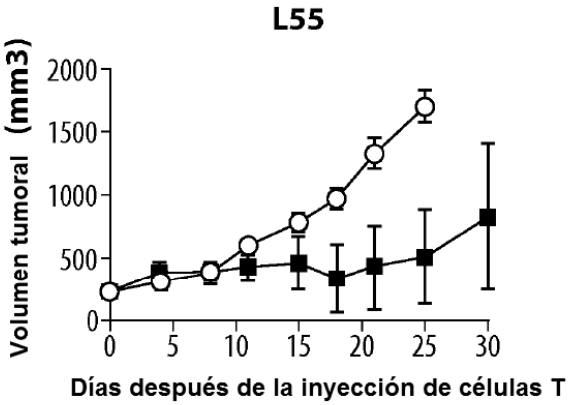


Fig. 10C

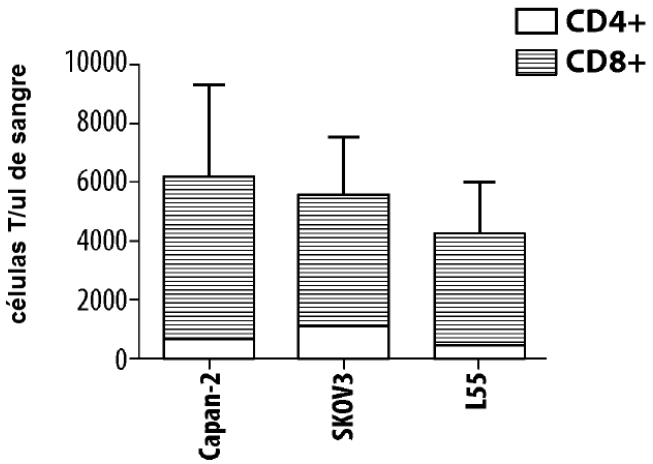


Fig. 10D

PI3K

ICOS WT - TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTL (SEQ ID: 40)

ICOS(FMFM) - TKKKYSSSVHDPNGEFMFMRAVNTAKKSRLTDVTL (SEQ ID: 46)

Fig. 11A

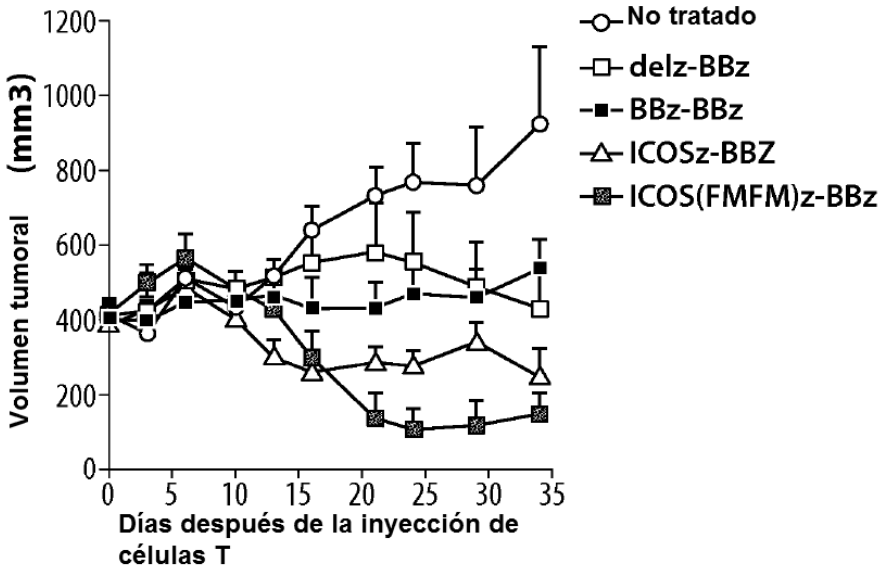


Fig. 11B

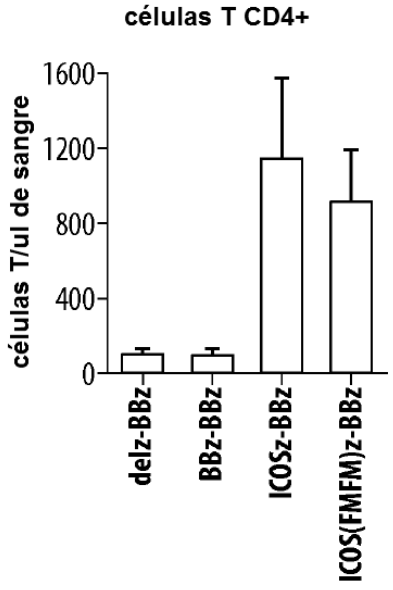


Fig. 11C

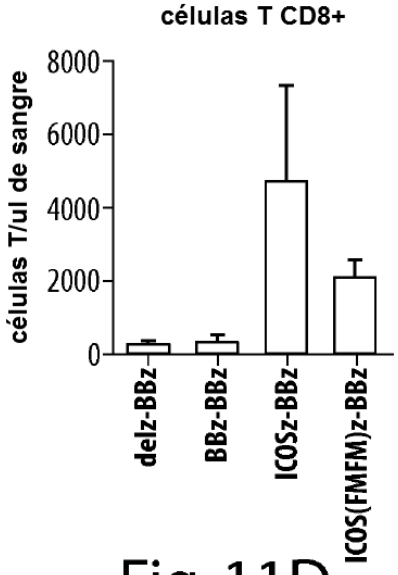


Fig. 11D

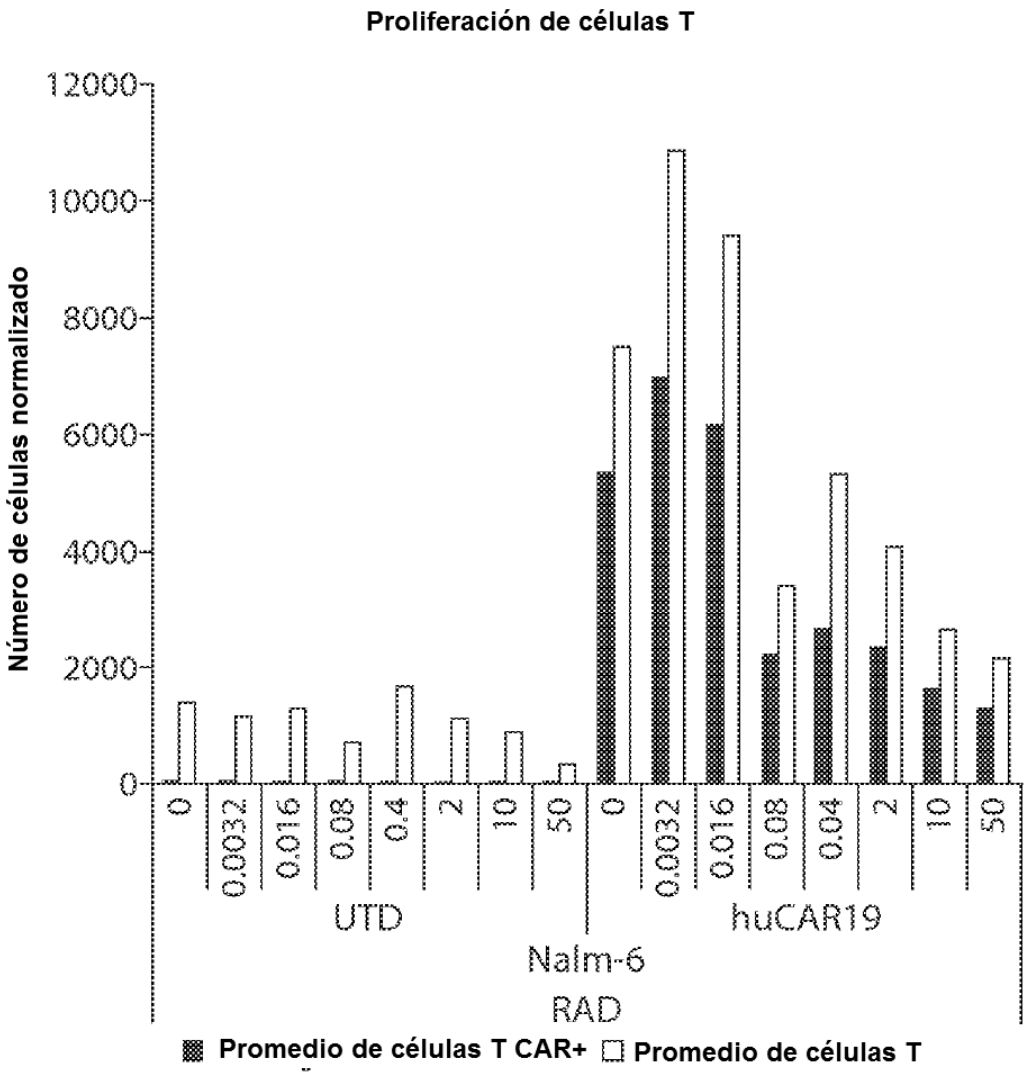

Proliferación de células T
Número de células normalizado
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
0.0032
0.016
0.08
0.4
2
10
50
0
0.0032
0.016
0.08
0.04
2
10
50
UTD
Nalm-6
RAD
huCAR19
Promedio de células T CAR+
Promedio de células T

Fig.12

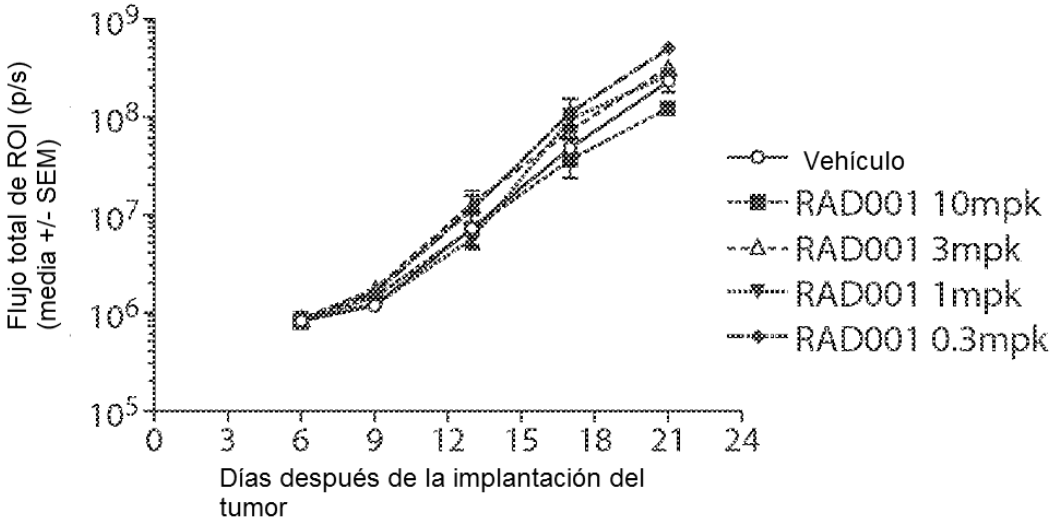

Flujo total de ROI (p/s)
(media +/- SEM)
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
0
3
6
9
12
15
18
21
24
Días después de la implantación del tumor
Vehículo
RAD001 10mpk
RAD001 3mpk
RAD001 1mpk
RAD001 0.3mpk

Fig. 13

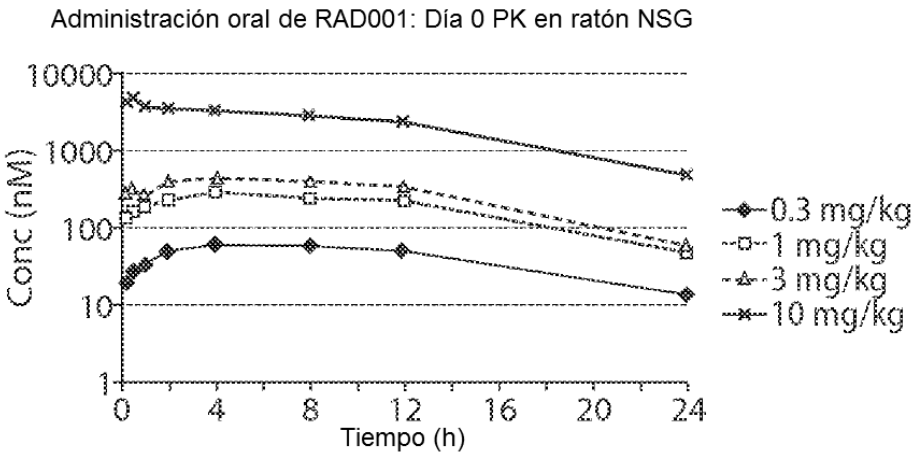


Fig. 14A

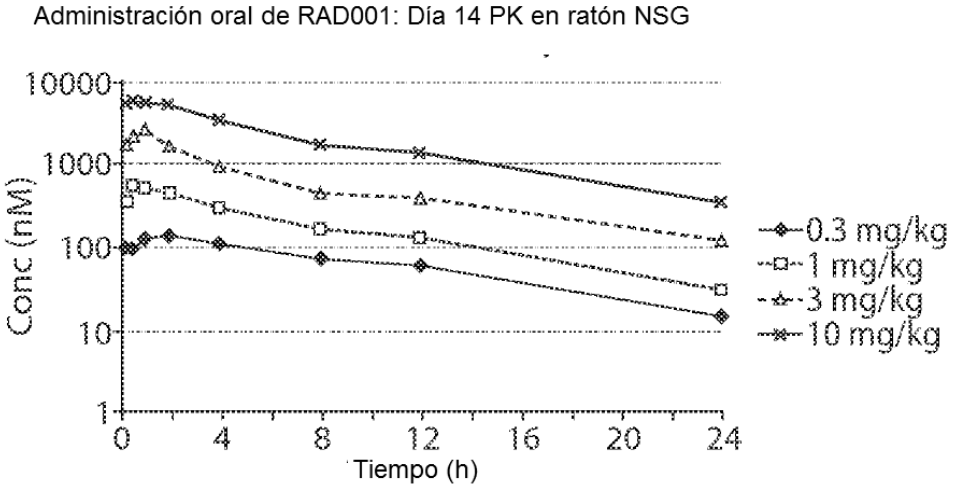


Fig. 14B

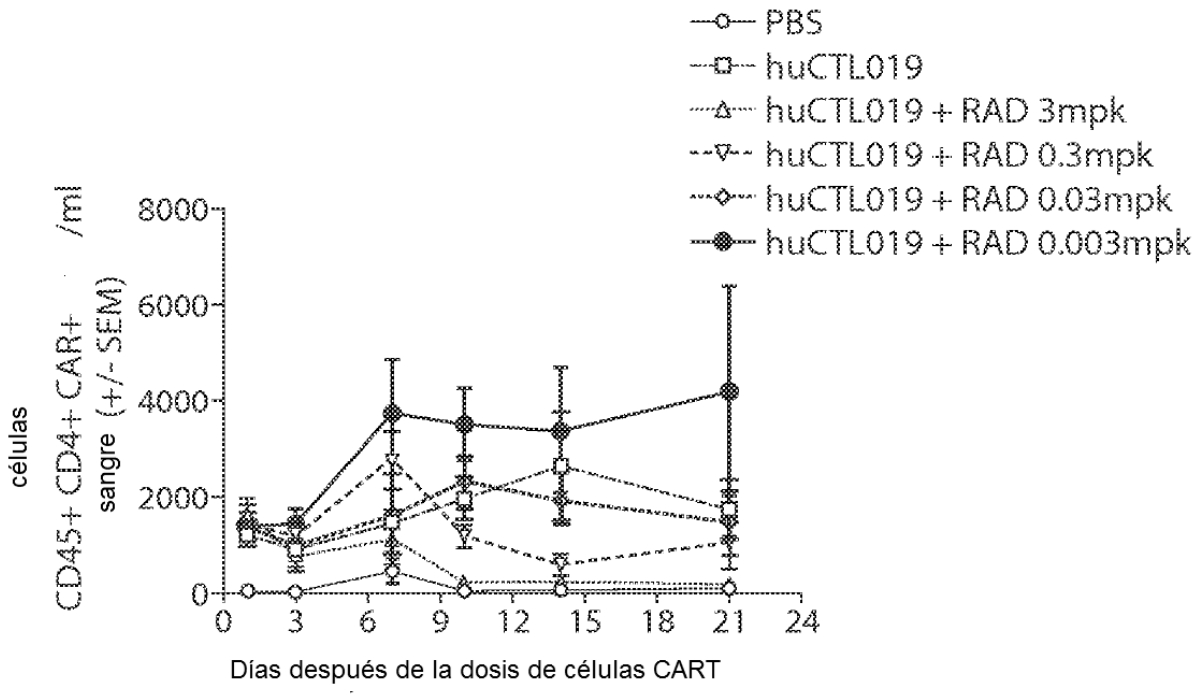


Fig. 15A

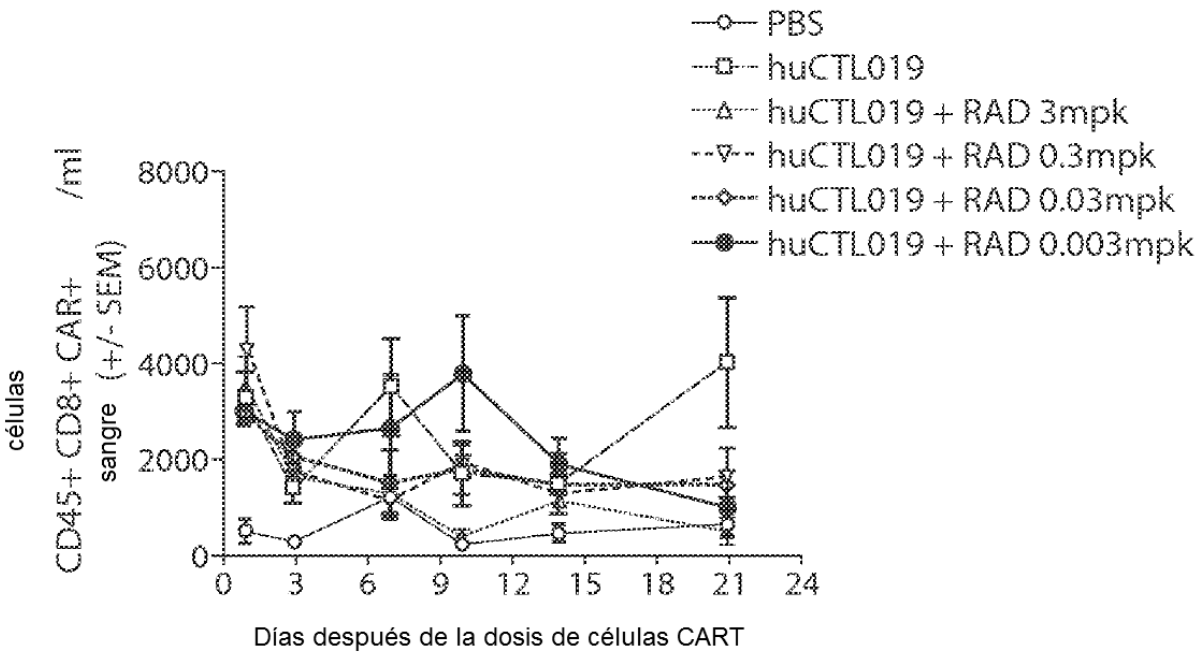


Fig. 15B