

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 848 478**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62	(2006.01)
C12N 5/0781	(2010.01)
C12N 5/0783	(2010.01)
C07K 19/00	(2006.01)
A61K 35/17	(2015.01)
A61P 35/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2016 PCT/AU2016/050851**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2017 WO17041143**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2016 E 16843305 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2020 EP 3347474**

54 Título: **Receptores quiméricos para antígenos y usos de estos**

30 Prioridad:

11.09.2015 AU 2015903719

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

09.08.2021

73 Titular/es:

**BIOSCEPTRE (UK) LIMITED (100.0%)
Babraham Hall, Babraham Research Campus
Babraham Cambridge CB22 3AT, GB**

72 Inventor/es:

**COOMBS, JUSTIN, TAYLOR;
BARRY, SIMON, CHARLES y
SADLON, TIMOTHY, JOHN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 848 478 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores quiméricos para antígenos y usos de estos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a receptores quiméricos para antígenos, linfocitos T que expresan receptores quiméricos para antígenos y receptores quiméricos para antígenos para su uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer, según el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

Antecedentes de la invención

10 El sistema inmunitario cuenta con mecanismos muy evolucionados y específicos que nos protegen de diversas patologías. Entre estas patologías se encuentra la detección y eliminación de patógenos no deseados como infecciones bacterianas, células infectadas por virus y, lo que es más importante, células mutadas que pueden causar neoplasias malignas (cáncer). La capacidad del sistema inmunitario para prevenir la formación y el crecimiento de cánceres depende de la capacidad de las células del sistema inmunitario para distinguir entre una célula "sana" y una célula "enferma" (p. ej., neoplásica o preneoplásica). Esto se logra mediante el reconocimiento de marcadores celulares (antígenos) que son indicativos de la transición en una célula de un estado sano a un estado enfermo.

15 Ha habido muchos intentos de desarrollar enfoques inmunoterapéuticos para tratar el cáncer al manipular o dirigir el sistema inmunitario a células diana que expresan antígenos de células cancerosas. Los enfoques inmunoterapéuticos se han centrado en gran medida en explotar el sistema inmunitario humoral mediante la utilización de anticuerpos aislados o diseñados o, más recientemente, la rama celular del sistema inmunitario.

20 Los primeros intentos de utilizar inmunoterapia celular para el tratamiento del cáncer utilizaron linfocitos T aislados de tumores y expandidos *ex vivo*. Si bien este enfoque ha proporcionado alguna promesa inicial en las primeras investigaciones, existen muchos desafíos técnicos asociados con este enfoque. La capacidad de aislar y expandir poblaciones de linfocitos T a cantidades clínicamente relevantes es técnicamente desafiante y la naturaleza mal controlada de la expansión da como resultado una población final de linfocitos T que es claramente heterogénea y puede contener solo una pequeña cantidad de linfocitos T específicos para el antígeno canceroso. Como resultado, la eficacia de este método es impredecible y variable.

25 Con el fin de abordar algunas de las deficiencias relacionadas con el uso de linfocitos T expandidos *ex vivo* aislados de tumores, los receptores quiméricos para antígenos (CAR o receptores de linfocitos T artificiales) comenzaron a desarrollarse a fines de la década de 1980. Los receptores quiméricos para antígenos se crean al enlazar una región extracelular que es específica para un antígeno deseado a una región de señalización, lo que da como resultado un receptor específico para antígeno que puede inducir la función de los linfocitos T.

30 La transformación de linfocitos T aislados con CAR da como resultado una población de linfocitos T que son específicos para un antígeno dado. Como resultado, se pueden generar grandes poblaciones de linfocitos T específicos para antígeno y utilizarlas para inmunoterapia.

35 Los ensayos clínicos iniciales de linfocitos T transformados con CAR específicos para antígenos asociados a tumores fueron prometedores. Sin embargo, la eficacia de los linfocitos T transformados con CAR condujo a una hiperfibrinemia significativa y, en última instancia, a la muerte de algunos pacientes. Se cree en gran medida que estos efectos adversos son inducidos por la actividad específica para la diana, pero inespecífica para el tumor, de los linfocitos T transformados con CAR inducida como resultado de la expresión endógena del antígeno afin para el CAR en poblaciones de células sanas, no cancerosas.

40 La publicación internacional WO 2012/079000 A1 describe la generación de linfocitos T modificados genéticamente que expresan un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y múltiples regiones de señalización.

La publicación internacional WO 2014/055657 A1 describe la generación de linfocitos T genéticamente modificados que contienen un primer y un segundo CAR, en donde cada uno contiene distintas regiones de señalización.

45 La publicación internacional WO 2011/075789 A1 describe el uso de anticuerpos dirigidos contra receptores P2X7 no funcionales para la terapia del cáncer.

La publicación internacional WO 2011/020155 A1 describe anticuerpos específicos contra receptores P2X7 no funcionales y la generación de proteínas de fusión para dirigir un polipéptido heterólogo o un agente citotóxico conjugado a una célula cancerosa.

50 BARDEN, J.A. et al., revelan una visión general de la expresión del receptor P2X7 no funcional en diferentes líneas celulares y proponen nP2X7 como una diana terapéutica para la terapia del cáncer.

Por lo tanto, es evidente que existe la necesidad de desarrollar un CAR que se dirija a un antígeno asociado a un tumor que es expresado selectivamente por células cancerosas, pero no expresado endógenamente en células no cancerosas.

La descripción de documentos, acciones, materiales, dispositivos, artículos y similares se incluye en esta memoria descriptiva únicamente con el propósito de proporcionar un contexto para la presente invención. No se sugiere ni se representa que alguno o todos estos asuntos formen parte de la base de la técnica anterior o fueran de conocimiento general común en el campo relevante para la presente invención tal como existía antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

Compendio de la invención

La presente invención se basa en parte en el reconocimiento de que debido a la actividad significativa "específica para la diana" pero "inespecífica para el tumor" de las células inmunitarias que expresan CAR, existe la necesidad de desarrollar un CAR y una célula modificada genéticamente que lo expresa, que se dirija a un marcador asociado específicamente con una variedad de células neoplásicas (cancerosas) o preneoplásicas (precancerosas). Los inventores han reconocido que un receptor P2X₇ disfuncional es un marcador adecuado para dirigirse con un CAR.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un receptor quimérico para antígeno que incluye un dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce un receptor P2X₇ disfuncional; un dominio transmembrana; y un dominio de señalización que incluye una porción de señalización intracelular de un receptor de activación y/o una porción de señalización intracelular de un receptor coestimulador.

En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno reconoce un epítipo asociado con un sitio de unión a trifosfato de adenosina (ATP) del receptor P2X₇ disfuncional. En algunas realizaciones, el receptor P2X₇ disfuncional tiene una capacidad reducida para unirse a ATP en el sitio de unión a ATP en comparación con la capacidad de unión a ATP de un receptor P2X₇ natural (funcional). En algunas realizaciones, el receptor P2X₇ disfuncional no puede unirse a ATP en el sitio de unión a ATP.

En algunas realizaciones, el receptor P2X₇ disfuncional tiene un cambio conformacional que hace que el receptor sea disfuncional. En algunas realizaciones, el cambio conformacional es un cambio de un aminoácido de la conformación trans a la conformación cis. En algunas realizaciones, el aminoácido que ha cambiado de una conformación trans a una conformación cis es prolina en la posición aminoacídica 210 del receptor P2X₇ disfuncional.

En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno reconoce un epítipo que incluye la prolina en la posición aminoacídica 210 del Receptor P2X₇ disfuncional. En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno reconoce un epítipo que incluye uno o más residuos aminoacídicos que van desde la glicina en la posición aminoacídica 200 hasta la cisteína en la posición aminoacídica 216, inclusive, del receptor P2X₇ disfuncional.

El dominio de reconocimiento de antígeno del CAR puede ser cualquier molécula adecuada que pueda interactuar y reconocer específicamente un receptor P2X₇ disfuncional. Sin embargo, en algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno incluye homología de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo, o un fragmento de este, que se une al receptor P2X₇ disfuncional. En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno incluye homología de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de una porción de unión a antígeno de fragmento (Fab) de un anticuerpo que se une a un receptor P2X₇ disfuncional. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno incluye la homología de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) o un scFv multivalente que se une a un receptor P2X₇ disfuncional. En algunas realizaciones, el scFv multivalente es un scFv divalente o trivalente.

En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno incluye homología de secuencia de aminoácidos con un dominio de anticuerpo único (sdAb, por sus siglas en inglés) que se une a un receptor P2X₇ disfuncional.

En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno incluye un péptido de unión que incluye homología de secuencia de aminoácidos con una o más regiones CDR de un anticuerpo que se une a un receptor P2X₇ disfuncional. En algunas realizaciones, el péptido vinculante incluye homología de secuencia de aminoácidos con los dominios CDR1, 2 y 3 de la cadena V_H y/o V_L de un anticuerpo que se une a un receptor P2X₇ disfuncional. En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno incluye una o más secuencias de aminoácidos que son al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 94 % idénticas a una cualquiera de las regiones que abarcan las posiciones 30 a 35, 50 a 67 o 98 a 108 de las secuencias establecidas en las SEQ ID NOS: 10, 32, 33 o 34. En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno incluye una o más de las secuencias que abarcan las posiciones 30 a 35, 50 a 67 o 98 a 108 de las secuencias establecidas en las SEQ ID NOS: 10, 32, 33 o 34. En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno incluye una o más de las secuencias establecidas en las SEQ ID NOS: 10, 32, 33 o 34.

En algunas realizaciones, el dominio de señalización incluye una porción derivada de un receptor de activación. En algunas realizaciones, el receptor de activación es un miembro del complejo de correceptor de CD3 o es un receptor Fc. En algunas realizaciones, la porción derivada del complejo correceptor de CD3 es CD3-ζ. En algunas realizaciones, la porción derivada del receptor Fc es FcεRI o FcγRI.

En algunas realizaciones, el dominio de señalización incluye una porción derivada de un receptor coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización incluye una porción derivada de un receptor de activación y una porción derivada de un receptor coestimulador. En algunas realizaciones, el receptor coestimulador se selecciona del grupo que consiste en CD27, CD28, CD30, CD40, DAP10, OX40, 4-1BB (CD137) e ICOS.

5 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica el receptor quimérico para antígeno según el primer aspecto de la invención.

10 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una construcción de ácido nucleico que incluye una molécula de ácido nucleico según el segundo aspecto de la invención. En algunas realizaciones, la expresión de la molécula de ácido nucleico está bajo el control de una secuencia de control de la transcripción. En algunas realizaciones, la secuencia de control de la transcripción puede ser un promotor constitutivo o un promotor inducible.

En algunas realizaciones del tercer aspecto de la invención, la construcción de ácido nucleico incluye además un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES, por sus siglas en inglés) que permite el inicio de la traducción dentro del ARNm una vez expresado a partir de la construcción de ácido nucleico.

15 En algunas realizaciones del tercer aspecto de la invención, la construcción de ácido nucleico es un vector tal como un vector viral, que puede usarse para transformar un linfocito T para inducir la expresión del CAR.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una célula modificada genéticamente que incluye un CAR según el primer aspecto de la invención. En algunas realizaciones, la célula incluye dos o más CAR diferentes.

20 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una célula genéticamente modificada que incluye una molécula de ácido nucleico según el segundo aspecto de la invención, o una construcción de ácido nucleico según el tercer aspecto de la invención, o una forma genómicamente integrada de la construcción. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico o la construcción de ácido nucleico codifica dos o más CAR diferentes.

En algunas realizaciones de los aspectos cuarto y quinto de la invención, los dos o más CAR diferentes tienen dominios de señalización diferentes.

25 En algunas realizaciones de los aspectos cuarto y quinto de la invención, la célula incluye un primer CAR con un dominio de señalización que incluye una porción derivada de un receptor de activación y un segundo CAR con un dominio de señalización que incluye una porción derivada de un receptor coestimulador. En algunas realizaciones, el receptor de activación es un miembro del complejo de correceptor de CD3 o es un receptor Fc. En algunas realizaciones, el receptor coestimulador se selecciona del grupo que consiste en CD27, CD28, CD30, CD40, DAP10, OX40, 4-1BB (CD137) e ICOS.

30 En algunas realizaciones de los aspectos cuarto y quinto de la invención, la célula se modifica adicionalmente para expresar constitutivamente receptores coestimuladores. En algunas realizaciones, la célula se modifica adicionalmente para expresar ligandos para los receptores coestimuladores, facilitando así la autoestimulación de la célula.

35 En algunas realizaciones de los aspectos cuarto y quinto de la invención, la célula se modifica adicionalmente para secretar citocinas. En algunas realizaciones, las citocinas se seleccionan del grupo que consiste en IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17 e IL-21, o una combinación de estas.

En algunas realizaciones de los aspectos cuarto y quinto de la invención, la célula es un leucocito. En algunas realizaciones, la célula es una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), un linfocito, un linfocito T (que incluye un linfocito T CD4+ o un linfocito T CD8+), una célula citolítica natural o un linfocito T citolítico natural.

40 En un sexto o séptimo aspecto, la presente invención proporciona una célula genéticamente modificada según la invención para su uso en un método para destruir una célula que expresa un P2X₇ disfuncional, el método que incluye exponer la célula que expresa un receptor P2X₇ disfuncional a una célula genéticamente modificada según los aspectos cuarto o quinto de la invención.

45 En algunas realizaciones de los aspectos sexto y séptimo de la invención, la célula que expresa un receptor P2X₇ disfuncional se expone a la célula genéticamente modificada junto con una citocina exógena. En algunas realizaciones, la célula modificada genéticamente es una célula modificada genéticamente, autóloga de la célula que expresa un receptor P2X₇ disfuncional.

50 En algunas realizaciones de los aspectos sexto y séptimo de la invención, la célula que expresa un receptor P2X₇ disfuncional es una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en; cáncer de cerebro, cáncer de esófago, cáncer de boca, cáncer de lengua, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cánceres de células epiteliales, cáncer de piel, leucemia, linfoma, mieloma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio y cáncer de testículo. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en; cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon,

cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cánceres de vagina, cánceres de células epiteliales, cáncer de piel, cánceres relacionados con la sangre, cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer de útero y cáncer de testículo.

5 En algunas realizaciones de los aspectos sexto y séptimo de la invención, el cáncer es metastásico. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer en etapa III o es cáncer en etapa IV.

10 En un octavo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que incluye una célula modificada genéticamente según el cuarto o quinto aspecto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica incluye adyuvantes adecuados que pueden consistir en citocinas. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica también puede incluir un intermediario como se describe en la presente memoria.

Breve descripción de las figuras

Para una mayor comprensión de los aspectos y ventajas de la presente invención, debe hacerse referencia a la siguiente descripción detallada, tomada junto con los dibujos adjuntos.

15 **Figura 1** - un esquema que muestra la disposición de un receptor quimérico para antígeno (CAR) anti-receptor P2X₇ disfuncional (nf) según una realización de la presente invención.

Figura 2 - un esquema que muestra el plásmido BLIV utilizado para la expresión del CAR anti-receptor P2X₇ nf en la Figura 1.

Figura 3 - un gel de electroforesis que muestra fragmentos de restricción de ADN restringido por *Bam*HI aislado de clones de *E. coli* transformados con el plásmido BLIV.

20 **Figura 4** - un gel de electroforesis que muestra fragmentos de restricción de ADN restringido por *Eco*RI, *Bam*HI y *Pst*I aislado de clones de *E. coli* seleccionados transformados con el plásmido BLIV.

Figura 5 - muestra imágenes de microscopía de células 293T transfectadas con plásmidos necesarios para la construcción de vectores lentivirales que contienen la construcción BLIV-CAR-bisagra corta y células 293T transducidas con sobrenadante que contiene los vectores lentivirales.

25 **Figura 6** - muestra imágenes de microscopía de células 293T transfectadas con plásmidos necesarios para la construcción de vectores lentivirales que contienen la construcción BLIV-CAR-bisagra larga y células 293T transducidas con sobrenadante que contiene los vectores lentivirales.

Figura 7 - Análisis FACS de la pureza celular de los linfocitos T purificados con el kit de enriquecimiento de linfocitos T CD8⁺ humanos RosetteSep.

30 **Figura 8** - Análisis FACS de ensayos de destrucción que comprenden el cocultivo de linfocitos T CD8⁺ y células BT549.

Figura 9 - Gráfico que ilustra el porcentaje de células diana marcadas con tinte eliminadas después de 48 horas de cocultivo con linfocitos T CD8⁺ transducidos con vectores lentivirales que contienen los plásmidos BLIV-CAR-bisagra corta y BLIV-CAR-bisagra larga en comparación con linfocitos T CD8⁺ no transducidos y linfocitos T CD8⁺ transducidos con plásmidos BLIV vacíos.

35 **Figura 10** - Alineación de los péptidos de unión PEP2-2-1-1, PEP2-472-2 y PEP2-2-12 con anticuerpos dirigidos contra el receptor P2X₇ nf.

Figura 11 - Un esquema que muestra la disposición de un CAR anti-receptor P2X₇ nf según una realización adicional de la presente invención.

40 **Figura 12** - Un esquema que muestra el plásmido pCDH utilizado para la expresión de un CAR anti-receptor P2X₇ nf de la Figura 11.

Figura 13 - Un gel de electroforesis que muestra fragmentos de restricción de ADN restringido por *Eco*RI y *Not*I aislado de clones de Sure 2 seleccionados, transformados con el plásmido pCDH.

Figura 14 - Análisis FACS de la eficacia de transfección de células HEK293T.

Figura 15 - Histogramas representativos del análisis FACS de la eficacia de la transducción lentiviral.

45 **Figura 16** - Análisis FACS del porcentaje de células CD8 transducidas que expresan GFP.

Figura 17 - Ilustración de la cadena principal de la proteína de fusión para la generación de receptores P2X₇ disfuncionales y funcionales.

Figura 18 - Un gel de electroforesis que muestra fragmentos de restricción de ADN restringido por *Bam* HI y *Pme*I

aislado de clones de *E.cloni* @10G seleccionados transformados con EXD2_K193A o EXD2_WT que contienen vectores pDONR-107.

Figura 19 - Un gel de electroforesis que muestra fragmentos de restricción de ADN restringido por *Bam* *HI* aislado de clones de *E.cloni*@10G seleccionados transformados con EXD2_K193A o EXD2_WT que contienen vectores pLV-416.

5 **Figura 20** - Análisis FACS de transducción de empaquetamiento lentiviral de células HEK293 con pLV-416-EXD2_K193A y pLV-416-EXD2_WT.

Figura 21 - Análisis FACS de la transducción de HEK293 con lentivirus que contienen construcciones pLV-416-EXD2_K193A o pLV-416-EXD2_WT.

10 **Figura 22** - Gráfico que ilustra la destrucción de células diana HEK que expresan P2X₇ nf y células de cáncer de mama 231 mediante linfocitos T que expresan los CAR PEP2-2-1-1, PEP2-472-2

Descripción detallada de la invención

Las secuencias de nucleótidos y polipéptidos a las que se hace referencia en la presente memoria están representadas por un número de identificación de secuencia (SEQ ID NO:). En la Tabla 1 se proporciona un resumen de los identificadores de secuencia. También se proporciona una lista de secuencias al final de la memoria descriptiva.

15 **Tabla 1**

Resumen de identificadores de secuencia

Identificador de secuencia	Secuencia
SEC ID NO: 1	Secuencia de ARNm del receptor P2X ₇ humano
SEC ID NO: 2	Secuencia codificante (ADNc) del receptor P2X ₇ humano
SEC ID NO: 3	Secuencia de aminoácidos del receptor P2X ₇ humano
SEC ID NO: 4	Secuencia de aminoácidos de la cadena CD3ζ
SEC ID NO: 5	Secuencia de aminoácidos de la cadena CD3ε
SEC ID NO: 6	Secuencia de aminoácidos de la cadena CD3γ
SEC ID NO: 7	Secuencia de aminoácidos de la cadena CD3δ
SEC ID NO: 8	Secuencia de aminoácidos de FcεR1
SEC ID NO: 9	Secuencia de aminoácidos de FcγRI
SEC ID NO: 10	Secuencia de aminoácidos de PEP2-2-3
SEC ID NO: 11	Secuencia de nucleótidos de PEP2-2-3
SEC ID NO: 12	Secuencia de aminoácidos de señalización de CD8a
SEC ID NO: 13	Secuencia de nucleótidos de señalización de CD8a
SEC ID NO: 14	Secuencia de aminoácidos de bisagra larga
SEC ID NO: 15	Secuencia de nucleótidos de bisagra larga
SEC ID NO: 16	Secuencia de aminoácidos de bisagra corta
SEC ID NO: 17	Secuencia de nucleótidos de bisagra corta
SEC ID NO: 18	Secuencia de aminoácidos de una porción del receptor coestimulador de CD28
SEC ID NO: 19	Secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 18
SEC ID NO: 20	Secuencia de aminoácidos de una porción del receptor coestimulador de OX40
SEC ID NO: 21	Secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 20
SEC ID NO: 22	Secuencia de aminoácidos de una porción del complejo correceptor de CD3 zeta
SEC ID NO: 23	Secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 22
SEC ID NO: 24	Secuencia de aminoácidos de P2A
SEC ID NO: 25	Secuencia de nucleótidos de P2A
SEC ID NO: 26	Secuencia de aminoácidos de CAR del péptido de unión a PEP2-2-3 - bisagra larga

Identificador de secuencia	Secuencia
SEC ID NO: 27	Secuencia de aminoácidos de CAR del péptido de unión a PEP2-2-3 - bisagra corta
SEC ID NO: 28	Secuencia de nucleótidos de CAR del péptido de unión a PEP2-2-3 - bisagra larga
SEC ID NO: 29	Secuencia de nucleótidos de CAR del péptido de unión a PEP2-2-3 - bisagra corta
SEC ID NO: 30	Secuencia de aminoácidos líder de CD8 humano
SEC ID NO: 31	Secuencia de nucleótidos de CD8 humano
SEC ID NO: 32	Secuencia de aminoácidos del péptido de unión a PEP2-2-1-1
SEC ID NO: 33	Secuencia de aminoácidos del péptido de unión a PEP2-472-2
SEC ID NO: 34	Secuencia de aminoácidos del péptido de unión a PEP2-2-12
SEC ID NO: 35	Secuencia de nucleótidos del CAR PEP2-2-1-1
SEC ID NO: 36	Secuencia de nucleótidos del CAR PEP2-472-2
SEC ID NO: 37	Secuencia de nucleótidos del CAR PEP2-2-12
SEC ID NO: 38	Cebador pCHD-CMV-Dir
SEC ID NO: 39	Cebador pCHD-coGFP-Inv
SEC ID NO: 40	Cebador 2-2-1-1-Inv
SEC ID NO: 41	Cebador 2-2-1-1-Dir
SEC ID NO: 42	Cebador 2-472-2-Inv
SEC ID NO: 43	Cebador 2-472-2-Dir
SEC ID NO: 44	Cebador 2-12-2-Inv
SEC ID NO: 45	Cebador Com-For-1
SEC ID NO: 46	Cebador Com-For-2
SEC ID NO: 47	Bloque génico EXD2_K193A
SEC ID NO: 48	Bloque génico EXD2_WT
SEC ID NO: 49	Cebador EXD-F1
SEC ID NO: 50	Cebador EXD2-R1
SEC ID NO: 51	Cebador EXD2-F1
SEC ID NO: 52	Secuencia de aminoácidos del CAR PEP2-2-1-1
SEC ID NO: 53	Secuencia de aminoácidos del CAR PEP2-472-2
SEC ID NO: 54	Secuencia de aminoácidos del CAR PEP2-2-12

5 Los inventores han reconocido que debido a la actividad significativa "específica para la diana" pero "inespecífica para el tumor" de las células inmunitarias que expresan el receptor quimérico para antígeno (CAR), existe la necesidad de desarrollar un CAR, y una célula genéticamente modificada que lo exprese, que se dirija a un marcador asociado específicamente con células neoplásicas (cancerosas) o preneoplásicas (precancerosas). Los inventores han reconocido que un receptor P2X₇ disfuncional es un marcador adecuado para dirigirse a una célula inmunitaria que expresa CAR, en una variedad de cánceres.

10 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un receptor quimérico para antígeno (CAR) que incluye un dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce un receptor P2X₇ disfuncional; un dominio transmembrana; y un dominio de señalización que incluye una porción de señalización intracelular de un receptor de activación y/o una porción de señalización intracelular de un receptor coestimulador.

15 Los receptores quiméricos para antígenos son proteínas construidas artificialmente que tras la expresión en la superficie de una célula pueden inducir una respuesta celular específica para el antígeno. Un CAR incluye al menos dos dominios; el primer dominio es un dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce específicamente un antígeno, o más específicamente una porción o porciones de epítipo de un antígeno; y el segundo dominio es un dominio de señalización que es capaz de inducir, o participar en la inducción, de una vía de señalización intracelular.

La combinación de estos dos dominios determina la especificidad antigénica del CAR y la capacidad del CAR para

inducir una respuesta celular deseada, la última de las cuales también depende de la célula hospedante del CAR. Por ejemplo, la activación de un CAR expresado en un linfocito T colaborador y que tiene un dominio de señalización que comprende un dominio de activación de CD3, puede, una vez activado al encontrar su antígeno afín, inducir a que el linfocito T colaborador CD4+ secrete una variedad de citocinas. En otro ejemplo, el mismo CAR cuando se expresa en un linfocito T citotóxico CD8+, una vez activado por una célula que expresa el antígeno afín, puede inducir la liberación de citotoxinas que finalmente conducen a la inducción de la apoptosis de la célula que expresa el antígeno.

Además del dominio de reconocimiento de antígeno y el dominio de señalización, un CAR puede incluir además componentes o porciones adicionales. Por ejemplo, el CAR incluye un dominio transmembrana que puede comprender una porción del dominio de señalización del CAR o puede estar asociado con él. El dominio transmembrana es típicamente una o más hélices hidrófobas, que se extiende por la bicapa lipídica de una célula e incrusta el CAR dentro de la membrana celular. El dominio transmembrana del CAR puede ser un determinante en el patrón de expresión del CAR cuando se asocia con una célula. Por ejemplo, el uso de un dominio transmembrana asociado con un correceptor de CD3 puede permitir la expresión del CAR en linfocitos T indiferenciados, mientras que el uso de un dominio transmembrana de un correceptor de CD4 puede dirigir la expresión de un CAR en linfocitos T colaboradores, pero no linfocitos T citotóxicos.

Otro componente o porción de un CAR puede ser un dominio enlazador. El dominio enlazador (también conocido como espaciador o dominio bisagra) puede extenderse desde el lado extracelular del dominio transmembrana hasta el dominio de reconocimiento de antígeno, uniendo así el dominio de reconocimiento de antígeno al dominio transmembrana. Aunque en algunos casos no se requiere un dominio enlazador para un CAR funcional (es decir, el dominio de reconocimiento de antígeno se puede conectar directamente al dominio transmembrana), en algunas circunstancias el uso de un dominio enlazador permite una mayor eficacia del CAR. El dominio enlazador puede tener una variedad de funciones que incluyen permitir la flexibilidad del CAR para permitir la orientación necesaria del dominio de reconocimiento de antígeno del CAR para unirse a un antígeno. En consecuencia, el dominio enlazador puede ser cualquier secuencia de aminoácidos que realice esta función. Un ejemplo no limitante de un dominio enlazador es un dominio que tiene homología de secuencia de aminoácidos con la región bisagra de un anticuerpo IgG, tal como la región bisagra de IgG1. Los ejemplos alternativos incluyen secuencias de aminoácidos que tienen homología de secuencia con la región CH₂CH₃ de un anticuerpo o porciones del complejo correceptor de CD3, el correceptor de CD4 o el correceptor de CD8.

El receptor P2X₇ (receptor purinérgico P2X, canal iónico controlado por ligando, 7) es un canal iónico controlado por ATP que se expresa en varias especies, incluidos los seres humanos. El receptor está codificado por un gen, cuyo símbolo oficial está representado por *P2RX7*. El gen también se ha denominado purinoceptor 7 de P2X, receptor de ATP, receptor de P2Z, receptor de P2X7 y variante A del receptor de P2X7 purinérgico. Para los fines de la presente divulgación, el gen y el receptor codificado se denominarán en el presente documento *P2X7* y P2X₇, respectivamente.

Las secuencias de ARNm, codificante (ADNc) y de aminoácidos del gen *P2X7* humano se establecen en las SEQ ID NO: 1 a 3, respectivamente. Las secuencias de ARNm y de aminoácidos del gen *P2X7* humano también están representadas por los números de acceso de GenBank NM_002562.5 y NP_002553.3, respectivamente. El gen *P2X7* se conserva en chimpancé, mono Rhesus, perro, vaca, ratón, rata, cerdo, pollo, pez cebra y rana. Se puede acceder a más detalles del gen *P2X7* humano y de otras especies desde la base de datos GenBank en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Por ejemplo, el número de identificación del gen para *P2X7* humano es 5027, para el de chimpancé es 452318, para el de mono es 699455, para el de perro es 448778, para el de vaca es 286814, para el de ratón es 18439, para el de pez cebra es 387298 y para el de rana es 398286. Además, al menos 73 organismos tienen ortólogos con el gen *P2X7* humano.

También se pueden encontrar más detalles sobre el gen *P2X7* humano y de otras especies en el portal UniGene del NCBI (por ejemplo, ver UniGene Hs. 729169 para P2X₇ humano <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?UGID=4540770&TAXID=9606&SEARCH>). Alternativamente, se puede acceder a los detalles de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para el gen *P2X7* desde la base de datos UniProt (www.uniprot.org) donde el ID de UniProt para el gen *P2X7* humano es Q99572. El contenido de los registros de GenBank y UniProt se incorpora en la presente memoria como referencia.

El receptor P2X₇ se forma a partir de tres subunidades proteicas (monómeros), en donde en el receptor natural en humanos al menos uno de los monómeros tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 3. Debe entenderse que un "receptor P2X₇" como se menciona en la presente memoria también incluye variaciones de origen natural del receptor, incluidas variantes de empalme, formas truncadas de origen natural y variantes alélicas del receptor. Un receptor P2X₇ también puede incluir subunidades que tienen una secuencia de aminoácidos modificada, por ejemplo, aquellas que incluyen truncamientos, eliminaciones de aminoácidos o modificaciones del aminoácido establecido en la SEQ ID NO: 3.

Una "variante" del gen *P2X7* o la proteína codificada pueden presentar una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos, respectivamente, que sea al menos 80 % idéntica, al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica, al menos 98 % idéntica, al menos 99 % idéntica, o al menos 99,9 % idéntica a un receptor P2X₇ natural, por ejemplo.

El receptor P2X₇ se activa mediante la unión de ATP al sitio de unión a ATP del receptor. Esto conduce a la apertura

rápida (en milisegundos) de un canal que permite selectivamente el movimiento de pequeños cationes a través de la membrana. Después de un corto período de tiempo (en segundos) se forma un gran poro en la membrana de una célula que permite la penetración de moléculas de hasta 900 Da de tamaño por la membrana celular. Esta formación de poros conduce finalmente a la despolarización de la célula y en muchos casos a la citotoxicidad y muerte celular. Este papel conduce a la creencia de que el receptor P2X₇ está involucrado en la apoptosis en una variedad de tipos de células.

Al igual que otras moléculas involucradas en la apoptosis, como Bcl2 y Bax, una disminución o pérdida en la función del receptor P2X₇ puede conducir a una célula que es comparativamente resistente a la apoptosis inducida. En muchos casos, esta resistencia a la apoptosis es fundamental en la transición de una célula "sana" normal a una célula precancerosa o cancerosa mutada. En consecuencia, la capacidad de apuntar a las células que tienen una función disminuida, o una pérdida de función, del receptor P2X₇ proporciona una diana prometedor para la terapia del cáncer.

En consecuencia, en el primer aspecto de la invención, el CAR reconoce un receptor P2X₇ disfuncional. Tal como se utiliza en toda la memoria descriptiva, el término "disfuncional" con referencia al receptor P2X₇ incluye una disminución en la función del receptor con respecto a su función comparativa en una célula normal no tumoral. En algunas realizaciones, la función del receptor P2X₇ se puede reducir en al menos 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más del 99 %. En algunas realizaciones, el término "disfuncional" puede incluir un receptor P2X₇ que no es funcional. Es decir que el receptor P2X₇ no puede inducirse para permitir la permeabilidad de cationes y otras moléculas a través de la membrana celular.

Cualquier cambio en la forma natural o nativa del receptor P2X₇ que conduce a un receptor disfuncional se incluye en la presente memoria. Por ejemplo, el receptor disfuncional puede ser el resultado de una mutación o alteración en uno o más aminoácidos del receptor que están asociados con la unión de ATP al receptor. En efecto, el receptor P2X₇ es disfuncional ya que tiene una capacidad reducida o no puede unirse a ATP en el sitio de unión a ATP. En este caso, el dominio de reconocimiento de antígeno del receptor quimérico para antígeno reconocerá un epítipo del receptor P2X₇ disfuncional asociado con el sitio de unión a ATP. En consecuencia, en algunas realizaciones del primer aspecto de la invención, el dominio de reconocimiento de antígeno del receptor quimérico para antígeno reconoce un epítipo del receptor P2X₇ disfuncional asociado con el sitio de unión a ATP. En algunas realizaciones, el receptor P2X₇ disfuncional tiene una capacidad reducida para unirse a ATP en comparación con la capacidad de unión a ATP de un receptor P2X₇ natural (funcional). En algunas realizaciones, el receptor P2X₇ disfuncional no puede unirse a ATP.

Una alteración en uno o más aminoácidos del receptor P2X₇ puede incluir un cambio conformacional en uno o más aminoácidos del receptor. Por lo tanto, en algunas realizaciones del primer aspecto de la invención, el receptor quimérico para antígeno se une a un receptor P2X₇ disfuncional que tiene un cambio conformacional que hace que el receptor sea disfuncional. Específicamente, este cambio conformacional puede ser un cambio en uno o más aminoácidos del receptor P2X₇ de una conformación trans a una conformación cis. En algunas realizaciones, una prolina en la posición 210 del receptor P2X₇ cambia de una conformación trans a una conformación cis. En este caso, el dominio de reconocimiento de antígenos del CAR puede reconocer un epítipo que incluye prolina en la posición aminoacídica 210 del receptor P2X₇. En algunas realizaciones del primer aspecto de la presente invención, el dominio de reconocimiento de antígeno reconoce un epítipo que incluye uno o más aminoácidos que van desde la glicina en la posición aminoacídica 200 hasta la cisteína en la posición aminoacídica 216 (inclusive) del receptor P2X₇ disfuncional. En algunas realizaciones del primer aspecto de la presente invención, el dominio de reconocimiento de antígenos reconoce un epítipo que incluye la prolina en la posición 210 del receptor P2X₇ disfuncional, y uno o más de los residuos de aminoácidos que van desde la glicina en la posición aminoacídica 200 hasta la cisteína en la posición aminoacídica 216 (inclusive) del receptor P2X₇ disfuncional.

Sin querer estar limitado por la teoría, como resultado del cambio conformacional de la prolina en la posición 210 del receptor P2X₇, la estructura tridimensional del receptor puede alterarse. Esta alteración en la estructura tridimensional puede permitir que el dominio de reconocimiento de antígenos del CAR se una a los aminoácidos o epítopos, previamente inaccesibles en la estructura tridimensional natural del receptor P2X₇. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el CAR reconoce uno o más epítopos de receptor P2X₇ expuestos al dominio de reconocimiento de antígeno como resultado de un cambio conformacional trans a cis de la prolina en la posición 210 de la SEQ ID NO: 3. Estos epítopos pueden incluir uno o más de los aminoácidos en la posición 200 a 210, o posiciones 297 a 306, inclusive, del receptor P2X₇. Por consiguiente, en algunas realizaciones del primer aspecto de la presente invención, el dominio de reconocimiento de antígeno reconoce un epítipo que incluye uno o más de los aminoácidos en las posiciones 200 a 210 y/o 297 a 306 del receptor P2X₇.

Tal como se utiliza en toda la memoria descriptiva, el término "reconoce" se refiere a la capacidad del dominio de reconocimiento de antígeno para asociarse con un receptor P2X₇ disfuncional, una porción de este, o un epítipo de este. En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno puede unirse directamente al receptor P2X₇ disfuncional, o un epítipo de este. En otras realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno puede unirse a una forma procesada del receptor P2X₇ disfuncional. Tal como se utiliza en este contexto, el término "forma procesada" se refiere a las formas del receptor P2X₇ que se ha truncado o digerido como resultado del procesamiento intracelular. En consecuencia, el reconocimiento de la "forma procesada" del receptor P2X₇ disfuncional puede ser el resultado de presentarse en asociación con un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés).

El dominio de reconocimiento de antígeno puede ser cualquier dominio adecuado que pueda reconocer un receptor

P2X₇ disfuncional, o epítipo de este. Como se usa en toda la memoria descriptiva, el término "dominio de reconocimiento de antígeno" se refiere a la parte del CAR que proporciona la especificidad del CAR para el receptor P2X₇ disfuncional. El dominio de reconocimiento de antígeno puede ser todo o simplemente parte de la región extracelular del CAR. Los dominios de reconocimiento de antígeno adecuados incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos que tienen homología de secuencia con el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo, o fragmento de este, que se unen a un receptor P2X₇ disfuncional. Por lo tanto, en algunas realizaciones del primer aspecto de la invención, el dominio de reconocimiento de antígeno incluye una secuencia de aminoácidos que tiene homología con un anticuerpo, o un fragmento de este, que se une a un receptor P2X₇ disfuncional. En algunas realizaciones, una porción del dominio de reconocimiento de antígenos incluye una secuencia de aminoácidos que tiene homología con un anticuerpo, o un fragmento de este, que se une al Receptor P2X₇ disfuncional. La secuencia del anticuerpo homólogo de origen puede ser cualquier secuencia adecuada de un anticuerpo que tenga afinidad por el receptor P2X₇. Por ejemplo, la secuencia puede compartir homología de secuencia con un anticuerpo que se origina en una o más de las siguientes especies; primate humano, no humano, ratón, rata, conejo, oveja, cabra, hurón, canino, pollo, felino, conejillo de indias, hámster, caballo, vaca o cerdo. El dominio de reconocimiento de antígenos puede compartir homología de secuencia con la secuencia de un anticuerpo monoclonal producido a partir de una línea celular de hibridoma. Cuando la especie de origen de la secuencia de anticuerpo homóloga no es humana, el anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo humanizado. La secuencia del anticuerpo homólogo también puede ser de una especie animal distinta de mamífero, como un pez cartilaginoso (p. ej., anticuerpos IgNAR de tiburón - ver la publicación internacional WO2012/073048). Alternativamente, el dominio de unión al antígeno puede incluir andamios proteicos modificados que proporcionan una funcionalidad similar a la de los anticuerpos de tiburón, como los cuerpos i que tienen restos de unión basados en anticuerpos IgNAR de tiburón (ver la publicación internacional WO2005/118629). Además, el dominio de reconocimiento de antígeno podría ser, derivarse de, o podría compartir homología de secuencia con cualquier otra molécula de unión o péptido adecuado que pueda interactuar selectivamente con un receptor P2X₇ disfuncional con una afinidad suficiente para activar el dominio de señalización del CAR. Se conocen en la técnica métodos para la identificación de proteínas de unión a antígenos tales como, *inter alia*, barrido de bibliotecas de presentación de fagos, cromatografía de afinidad de proteínas, coimmunoprecipitación y sistemas de dos híbridos de levadura (ver Srinivasa Rao, V. et al. Proteomics Int J, 2014; Id. de artículo 147648).

En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno del CAR incluye una homología de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de una porción de unión a antígeno en fragmento (Fab) de un anticuerpo que se une a un receptor P2X₇ disfuncional. Como se entenderá en la técnica, una porción Fab de un anticuerpo está compuesta por una región constante y una región variable de cada una de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo. El Fab es la región determinante de antígeno del anticuerpo y se puede generar escindiendo enzimáticamente la región Fc de un anticuerpo.

En algunas realizaciones del primer aspecto de la invención, el dominio de reconocimiento de antígenos incluye la homología de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que se une a un receptor P2X₇ disfuncional. Como se entenderá en la técnica, un scFv es una proteína de fusión que comprende dos porciones que pueden compartir homología con, o pueden ser idénticas a, las cadenas variable-pesada (VH) y variable-ligera (VL) de un anticuerpo, con las dos porciones conectadas entre sí con un péptido enlazador. Por ejemplo, el scFv puede incluir secuencias de aminoácidos VH y VL que se derivan de un anticuerpo que reconoce un receptor P2X₇ disfuncional. En este contexto, se apreciará que el término "derivado de" no es una referencia a la fuente de los polipéptidos *per se*, sino que más bien se refiere a la derivación de la secuencia de aminoácidos que constituye una porción de la región de unión al antígeno. En consecuencia, el término "derivado de" incluye polipéptidos creados sintéticamente, artificialmente o que de otro modo comparten la identidad de secuencia con un anticuerpo que se une al receptor P2X₇ disfuncional.

En algunas realizaciones del primer aspecto de la invención, el dominio de reconocimiento de antígeno incluye la homología de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de un scFv multivalente que se une a un receptor P2X₇ disfuncional. En algunas realizaciones, el scFv multivalente es un scFv divalente o trivalente.

En algunas realizaciones del primer aspecto de la invención, el dominio de reconocimiento de antígeno tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio de anticuerpo único (sdAb) que se une a un receptor P2X₇ disfuncional.

En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34 o una variante funcional de esta.

En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno incluye un péptido de unión que incluye homología de secuencia de aminoácidos con una o más regiones CDR de un anticuerpo que se une a un receptor P2X₇ disfuncional. En algunas realizaciones, el péptido de unión incluye una o más regiones que tienen homología de secuencia con los dominios CDR1, 2 y 3 de la cadena V_H y / o V_L de un anticuerpo que se une a un receptor P2X₇ disfuncional. En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno incluye una o más secuencias que son al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 94 % idénticas a cualquiera de las regiones CDR que abarcan las posiciones 30 a 35, 50 a 67 o 98 a 108 de las secuencias establecidas en SEQ ID NOS: 10, 32, 33 o 34. En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno incluye una o más de las secuencias que abarcan las posiciones 30 a 35, 50 a 67 o 98 a 108 de las secuencias establecidas en SEQ ID NOS: 10, 32, 33 o 34. Las secuencias que intercalan las regiones CDR de los péptidos de unión al antígeno indicadas en SEQ ID NOS: 10, 32, 33 o 34

pueden ser cualquier secuencia adecuada que permite la formación y conformación apropiadas de las regiones CDR. En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno incluye una secuencia 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, 95 % o 99 % idéntica a una de las secuencias establecidas en SEQ ID NOS: 10, 32, 33 o 34.

5 Anticuerpos dirigidos contra receptores P2X₇ disfuncionales, de los cuales se pueden derivar secuencias de aminoácidos adecuadas, y métodos para producir tales anticuerpos, se han descrito en la técnica (por ejemplo, las publicaciones internacionales WO2001/020155, WO2003/020762, WO2008/043145, WO2008/043146, WO2009/033233, WO2011/020155 y WO2011/075789). Un experto en la técnica conocerá métodos para generar anticuerpos policlonales y monoclonales para epítomos específicos (tales como los establecidos anteriormente). A modo de resumen, un epítomo deseado (como un segmento del receptor P2X₇ disfuncional que incluye la prolina en la posición 210) se inyecta en un animal huésped adecuado en presencia de una proteína portadora inmunógena apropiada y un adyuvante. A continuación, se recoge el suero del animal inmunizado y el anticuerpo puede aislarse basándose en su clase de anticuerpo o su especificidad de antígeno. Después de la evaluación de la idoneidad y especificidad del anticuerpo purificado, el anticuerpo puede procesarse adicionalmente para aislar fragmentos de unión al antígeno o secuenciarse para identificar los dominios VH y VL relevantes. Se conocen epítomos adecuados para la producción de anticuerpos dirigidos contra el receptor P2X₇ disfuncional en la técnica (ver las publicaciones internacionales WO2008/043146, WO2010/000041 y WO2009/033233 como ejemplos).

20 El dominio de señalización del CAR puede ser cualquier dominio adecuado que sea capaz de inducir o participar en la inducción de una cascada de señalización intracelular tras la activación del CAR como resultado del reconocimiento de un antígeno por el dominio de reconocimiento de antígeno del CAR. El dominio de señalización de un CAR se elegirá específicamente dependiendo del resultado celular deseado después de la activación del CAR.

25 Como se usa en toda la memoria descriptiva, el término "porción", cuando se usa con respecto a un receptor de activación o receptor coestimulador, se refiere a cualquier segmento del receptor que incluye una secuencia responsable de, o involucrada en, la iniciación/inducción de una cascada de señalización intracelular después de la interacción del receptor con su ligando o antígeno afin. A continuación, se describe un ejemplo de la iniciación/inducción de una cascada de señalización intracelular para el receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) a través de CD3.

30 Sin desear estar ligado a ninguna teoría, la porción extracelular del TCR comprende en gran parte heterodímeros de las cadenas clonotípicas TCR α y TCR β (el receptor TCR α/β) o las cadenas TCR γ y TCR δ (el receptor TCR $\gamma\delta$). Estos heterodímeros de TCR generalmente carecen de capacidades de transducción de señalización inherentes y, por lo tanto, están asociados de forma no covalente con múltiples subunidades de transducción de señales de CD3 (principalmente CD3-zeta, -gamma, -delta y -épsilon). Cada una de las cadenas gamma, delta y épsilon de CD3 tiene una porción intracelular (citoplásmica) que incluye un único motivo de activación basado en tirosina de inunorreceptores (ITAM, por sus siglas en inglés), mientras que la cadena CD3-zeta incluye tres ITAM en tándem. 35 Tras el acoplamiento del TCR con su antígeno afin en presencia de MHC, y la asociación de un correceptor requerido como CD4 o CD8, se inicia la señalización que da como resultado una tirosina cinasa (a saber, Lck) que fosforila los dos residuos de tirosina dentro de ITAM(s) intracelular(es) de las cadenas CD3. Posteriormente, se recluta una segunda tirosina cinasa (ZAP-70, activada a su vez por la fosforilación de Lck) para bifosforilar los ITAM. Como resultado, se activan varias proteínas diana posteriores, lo que eventualmente conduce a cambios conformacionales intracelulares, movilización de calcio y reordenación del citoesqueleto de actina que, cuando se combinan, finalmente conducen a la activación de factores de transcripción y la inducción de una respuesta inmunitaria de linfocitos T.

40 Tal como se utiliza en toda la memoria descriptiva, el término "receptor de activación" se refiere a receptores, o correceptores que forman un componente de, o están implicados en la formación del complejo del receptor de linfocitos T (TCR), o receptores implicados en la activación específica de células inmunitarias como resultado del reconocimiento de un estímulo antigénico u otro inmunógeno.

45 Los ejemplos no limitantes de tales receptores de activación incluyen componentes del complejo receptor de linfocitos T-CD3 (CD3-zeta, -gamma, -delta y -épsilon), el correceptor de CD4, el correceptor de CD8, los receptores de FC o receptores de activación asociados a células citolíticas (NK) tales como LY-49 (KLRA1), receptores de citotoxicidad naturales (NCR, preferiblemente NKp46, NKp44, NKp30 o NKG2 o el heterodímero CD94 / NKG2). En consecuencia, 50 en algunas realizaciones del primer aspecto de la presente invención, el dominio de señalización incluye una porción derivada de uno cualquiera o más de un miembro del complejo de correceptor de CD3 (preferiblemente la cadena CD3- ζ o una porción de esta), el correceptor de CD4, el correceptor de CD8, un receptor de Fc (FcR) (preferiblemente el Fc ϵ RI o Fc γ RI) o receptores asociados a NK tales como LY-49.

55 La porción de transducción de señales intracelulares específica de cada una de las cadenas CD3 se conoce en la técnica. A modo de ejemplo, la región citoplásmica intracelular de la cadena CD3 ζ abarca desde el aminoácido 52 hasta el aminoácido 164 de la secuencia establecida en SEQ ID NO: 4, con las tres regiones ITAM que abarcan los aminoácidos 61 a 89, 100 a 128 y 131 a 159 de SEQ ID NO: 4. Además, la porción intracelular de la cadena CD3 ϵ abarca los aminoácidos 153 a 207 de la secuencia establecida en SEQ ID NO: 5, con la única región ITAM que abarca los aminoácidos 178 a 205 de SEQ ID NO: 5. La porción intracelular de la cadena CD3 γ abarca los aminoácidos 138 60 a 182 de la secuencia establecida en SEQ ID NO: 6 con la región ITAM única que abarca los aminoácidos 149 a 177

de SEQ ID NO: 6. La porción intracelular de CD3 δ abarca los aminoácidos 127 a 171 de la secuencia establecida en SEQ ID NO: 7 con la región ITAM única que abarca los aminoácidos 138 a 166 de SEQ ID NO: 7.

5 En algunas realizaciones del primer aspecto de la presente invención, el dominio de señalización incluye una porción derivada de cualquiera de CD3 (preferiblemente la cadena CD3- ζ o una porción de esta) o un receptor de FC (preferiblemente el Fc ϵ RI o Fc γ RI). En algunas realizaciones, la porción del complejo de correceptor de CD3- ζ incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22, o una variante funcional de esta.

10 Las porciones intracelulares de los receptores de FC son conocidas en la técnica. Por ejemplo, las porciones intracelulares de Fc ϵ R1 abarcan los aminoácidos 1 a 59, 118 a 130 y 201 a 244 de la secuencia establecida en SEQ ID NO: 8. Además, la porción intracelular de Fc γ RI abarca los aminoácidos 314 a 374 de la secuencia establecida en SEQ ID NO: 9.

15 Se pueden utilizar varias combinaciones de porciones de receptores de activación para formar las porciones transmembrana (TM) e intracelular (IC) del CAR, por ejemplo, CD3 ζ TM y CD3 ζ IC (Landmeier S. et al. Cancer Res. 2007; 67: 8335-43; RD invitado. et al., J Immunother. 2005, 28: 203-11; Hombach AA. et al. J Immunol. 2007; 178: 4650-7), el CD4 TM y CD3 ζ IC (James SE. et al. J Immunol. 2008; 180: 7028-38), el CD8 TM y CD3 ζ IC (Patel SD. et al. Gene Ther. 1999; 6: 412-9), y el Fc ϵ R1 γ TM y el Fc ϵ R1 γ IC (Haynes NM. et al. J Immunol. 2001; 166: 182-7; Annenkov AE. et al. J Immunol. 1998; 161: 6604-13).

20 Tal como se utiliza en toda la memoria descriptiva, el término "receptor coestimulador" se refiere a receptores o correceptores que ayudan en la activación de una célula inmunitaria tras la inducción específica de antígeno de un receptor de activación. Como se entenderá, los receptores coestimuladores no requieren la presencia de antígeno y no son específicos de antígeno, pero son típicamente una de dos señales, siendo la otra una señal de activación, que se requiere para la inducción de una respuesta celular inmunitaria. En el contexto de una respuesta inmunitaria, un receptor de coestimulación se activa típicamente por la presencia de su ligando expresado en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC, por sus siglas en inglés), como una célula dendrítica o macrófago. Con respecto específicamente a los linfocitos T, la coestimulación es necesaria para conducir a la activación, proliferación, diferenciación y supervivencia celular (todas las cuales se denominan generalmente bajo el paraguas de activación de linfocitos T), mientras que la presentación de un antígeno a un linfocito T en la ausencia de coestimulación puede conducir a anergia, eliminación clonal y/o al desarrollo de tolerancia antigénica específica. Es importante destacar que las moléculas coestimuladoras pueden informar la respuesta de los linfocitos T a un antígeno encontrado simultáneamente. Generalmente, un antígeno encontrado en el contexto de una molécula coestimuladora "positiva" conducirá a la activación del linfocito T y una respuesta inmunitaria celular dirigida a eliminar las células que expresan ese antígeno. Mientras que un antígeno encontrado en el contexto de un correceptor "negativo" conducirá a un estado inducido de tolerancia al antígeno coencontrado.

35 Los ejemplos no limitantes de receptores coestimuladores de linfocitos T incluyen CD27, CD28, CD30, CD40, DAP10, OX40, 4-1BB (CD137), ICOS. Específicamente, CD27, CD28, CD30, CD40, DAP10, OX40, 4-1BB (CD137) e ICOS representan moléculas coestimuladoras "positivas" que mejoran la activación de una respuesta de linfocitos T. Por consiguiente, en algunas realizaciones del primer aspecto de la presente invención, el dominio de señalización incluye una porción derivada de uno cualquiera o más de CD27, CD28, CD30, CD40, DAP10, OX40, 4-1BB (CD137) e ICOS.

40 En algunas realizaciones del primer aspecto de la presente invención, el dominio de señalización incluye una porción derivada de los receptores coestimuladores CD28, OX40 o 4-1BB. En algunas realizaciones, el dominio de señalización incluye una parte del receptor coestimulador CD28. En algunas realizaciones, el dominio de señalización incluye una porción del receptor coestimulador OX40. En algunas realizaciones, la porción del receptor coestimulador OX40 incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 20, o una variante funcional de esta.

45 Se pueden utilizar varias combinaciones de porciones de receptores coestimuladores para formar las porciones transmembrana (TM) e intracelular (IC) del CAR. Por ejemplo, CD8 TM y DAP10 IC o CD8 TM y 4-1BB IC (Marin V. et al. Exp Hematol. 2007; 35: 1388-97), el CD28 TM y el CD28 IC (Wilkie S. et al. J Immunol. 2008; 180: 4901-9; Maher J. et al. Nat Biotechnol. 2002; 20: 70-5) y el CD8 TM y el CD28 IC (Marin V. et al. Exp Hematol. 2007; 35: 1388-97).

La información de la secuencia para los receptores coestimuladores y de activación mencionados anteriormente es fácilmente accesible en una variedad de bases de datos. Por ejemplo, en la Tabla 2 se proporcionan realizaciones de secuencias de aminoácidos, genes y ARNm humanos para estos receptores.

50 **Tabla 2**

Resumen de la información de la secuencia del receptor de activación y coestimulación

Nombre receptor	del	N.º de Ref. en Uniprot	N.º de identificación del gen en NCBI	N.º de Ref. del ARNm en GeneBank
CD3-zeta		P20963	919	GI:166362721
CD3-gamma		P09693	917	GI:166362738

Nombre receptor	del	N.º de Ref. en Uniprot	N.º de identificación del gen en NCBI	N.º de Ref. del ARNm en GeneBank
CD3-delta		P04234	915	GI:98985799
CD3-épsilon		P07766	916	GI:166362733
CD4		P0173	920	GI:303522473
CD8 alfa		P01732	925	GI:225007534
CD8 beta		P01966	926	GI:296010927
FcγRI		P12314	2209	GI:31331
FcεR1		Q01362	2206	GI:219881
Ly-49 (KLRA1)		Q7Z556	10748	GI:33114184
NKp46		O76036	9437	GI:3647268
NKp44		O95944	9436	GI:4493701
NKp30		O14931	259197	GI:5823969
CD94		Q13241	3824	GI:1098616
CD27		P26842	939	GI:180084
CD28		P10747	940	GI:338444
CD30		P28908	943	GI:180095
CD40		P25942	958	GI:29850
DAP10		Q9UBK5	10870	GI:5738198
OX40		P43489	7293	GI:472957
4-1BB (CD137)		Q07011	3604	GI:571320
ICOS		Q9Y6W8	29851	GI:9968295
CTLA-4		P16410	1493	GI:291928
PD-1		Q15116	5133	GI:2149002

Aunque la Tabla 2 se proporciona con referencia a los receptores de activación y coestimuladores humanos, una persona experta en la técnica entenderá que las versiones homólogas y ortólogas de cada receptor están presentes en la mayoría de las especies de mamíferos y vertebrados. Por lo tanto, las secuencias mencionadas anteriormente solo se proporcionan como ejemplos no limitantes de secuencias de receptores que pueden incluirse en un CAR del primer aspecto de la presente invención y las secuencias homólogas y ortólogas de cualquier especie deseada pueden usarse para generar un CAR que es adecuado para la especie dada.

En algunas realizaciones del primer aspecto de la invención, el dominio de señalización incluye una porción derivada de un receptor de activación y una porción derivada de un receptor coestimulador. Sin desear estar ligado a ninguna teoría, en este contexto el reconocimiento de un antígeno por el dominio de reconocimiento de antígeno del CAR inducirá simultáneamente tanto una señal de activación intracelular como una señal coestimuladora intracelular. En consecuencia, esto simulará la presentación de un antígeno por un ligando coestimulador que expresa APC. Alternativamente, el CAR podría tener un dominio de señalización que incluye una porción derivada de un receptor de activación o un receptor coestimulador. En esta forma alternativa, el CAR solo inducirá una cascada de señalización intracelular activante o una cascada de señalización intracelular coestimuladora.

En algunas realizaciones del primer aspecto de la invención, el CAR tendrá un dominio de señalización que incluye una porción derivada de un único receptor de activación y porciones derivadas de múltiples receptores coestimuladores. En algunas realizaciones, el CAR tendrá un dominio de señalización que incluye porciones derivadas de múltiples receptores de activación y una porción derivada de un único receptor coestimulador. En algunas realizaciones, el CAR tendrá un dominio de señalización que incluye porciones derivadas de múltiples receptores de activación y porciones derivadas de múltiples receptores coestimuladores. En algunas realizaciones, el CAR tendrá un dominio de señalización que incluye una porción derivada de un único receptor de activación y porciones derivadas de dos receptores coestimuladores. En algunas realizaciones, el CAR tendrá un dominio de señalización que incluye una porción derivada de un único receptor de activación y porciones derivadas de tres receptores coestimuladores. En algunas realizaciones, el CAR tendrá un dominio de señalización que incluye porciones derivadas de dos receptores de activación y una porción derivada de un receptor coestimulador. En algunas realizaciones, el CAR tendrá

un dominio de señalización que incluye porciones derivadas de dos receptores de activación y porciones derivadas de dos receptores coestimuladores. Como se entenderá, existen variaciones adicionales del número de receptores de activación y receptores coestimuladores de los que se puede derivar el dominio de señalización, y no se considera que los ejemplos anteriores limiten las posibles combinaciones incluidas en la presente memoria.

5 En algunas realizaciones del primer aspecto de la invención, el receptor quimérico para antígeno incluye la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54, o una variante funcional de SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54. En algunas realizaciones, la variante funcional incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54.

10 Como se indicó anteriormente, la presente invención incluye una variante funcional de cualquiera de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54. En el contexto de la presente invención, una "variante funcional" puede incluir cualquier secuencia de aminoácidos siempre que mantenga la función de cualquiera de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54.

15 Como tal, la variante funcional puede, por ejemplo, tener una o más inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos con respecto a una de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54; una forma mutante o variante alélica de una de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54; un ortólogo de uno de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54; un homeólogo de uno de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54; un análogo de uno de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54; y similares, siempre que la variante funcional mantenga la función de cualquiera de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54.

30 Por ejemplo, con respecto a SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54, la función de un receptor quimérico para antígeno que comprende SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54 es reconocer un receptor P2X₇ disfuncional sin reconocimiento significativo del receptor P2X₇ funcional, e inducir una señal intracelular que da como resultado la activación de un linfocito T que expresa el CAR. Como comprenderá un experto en la técnica, la variación de porciones de la secuencia de aminoácidos del receptor quimérico para antígeno establecida en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54 pueden realizarse sin una alteración significativa del reconocimiento del receptor P2X₇ disfuncional y/o activación de un linfocito T que expresa el CAR. Tales variaciones pueden incluir, pero no se limitan a, variaciones en la región de bisagra del receptor quimérico para antígeno, variaciones en el dominio transmembrana y variaciones en las porciones de los receptores de activación y/o receptores coestimuladores que comprenden el dominio intracelular del receptor quimérico para antígeno.

40 Como se indicó anteriormente, la variante funcional puede comprender sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos individuales con respecto a una de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54. Por ejemplo, un experto en la técnica reconocerá que cualquier aminoácido puede sustituirse con un aminoácido químicamente (funcionalmente) similar y conservar la función del polipéptido. Tales sustituciones conservadoras de aminoácidos son bien conocidas en la técnica. Los siguientes grupos en la Tabla 3 contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí.

Tabla 3

Sustituciones conservadoras de aminoácidos ilustrativas

Residuo original	Sustituciones ilustrativas	Residuo original	Sustituciones ilustrativas
Ala (A)	Val (V), Leu (L), Ile (I), Gly (G)	Leu (L)	Ile (I), Val (V), Met (M), Ala (A), Phe (F)
Arg (R)	Lys (K)	Lys (K)	Arg (R)
Asn (N)	Gln (Q), Su (H)	Met (M)	Leu (L), Phe (F)
Asp (D)	Glu (E)	Phe (F)	Leu (L), Val (V), Alal (A)
Cys (C)	Ser (S)	Pro (P)	Gly (G)

Residuo original	Sustituciones ilustrativas	Residuo original	Sustituciones ilustrativas
Gln (Q)	Asn (N), Su (H)	Ser (S)	Thr (T)
Glu (E)	Asp (D)	Thr (T)	Ser (S)
Gly (G)	Pro (P), Ala (A)	Trp (W)	Tyr (Y)
Su (H)	Asn (N), Gln (Q)	Tyr (Y)	Trp (W), Phe (F)
Ile (I)	Leu (L), Val (V), Ala (A)	Val (V)	Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Ala (A)

Además, si se desea, se pueden introducir aminoácidos no naturales o análogos de aminoácidos químicos como una sustitución o adición en un polipéptido incluido en la presente memoria. Dichos aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 2-aminobutírico, ácido 6-amino hexanoico, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, fluoro-alanina, aminoácidos de diseño tales como β -metil-aminoácidos, C α -metil-aminoácidos, N-metil-aminoácidos y análogos de aminoácidos en general.

Como se estableció anteriormente, una variante funcional de cualquiera de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54 puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a cualquiera de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54. En otras realizaciones, una variante funcional puede comprender al menos 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, al menos 91 % de identidad de secuencia de aminoácidos, al menos 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos, al menos 93 % de identidad de secuencia de aminoácidos, al menos 94 % de identidad de secuencia de aminoácidos, al menos 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, al menos 96 % de aminoácido identidad de secuencia, al menos 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos, al menos 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos, al menos 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos o al menos 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o 99,9 % de identidad de secuencia de aminoácidos con cualquiera de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO : 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54.

Cuando se comparan secuencias de aminoácidos, las secuencias deben compararse en una ventana de comparación que está determinada por la longitud del polipéptido. Por ejemplo, se contempla una ventana de comparación de al menos 20 residuos de aminoácidos, al menos 50 residuos de aminoácidos, al menos 75 residuos de aminoácidos, al menos 100 residuos de aminoácidos, al menos 200 residuos de aminoácidos, al menos 300 residuos de aminoácidos, al menos al menos 400 residuos de aminoácidos, al menos 500 residuos de aminoácidos, al menos 600 residuos de aminoácidos, o en toda la longitud de cualquiera de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO : 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54. La ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) de aproximadamente el 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación se puede realizar mediante implementaciones computarizadas de algoritmos tales como la familia de programas BLAST como, por ejemplo, divulgado por Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402. También se pueden utilizar programas de alineación global para alinear secuencias similares de aproximadamente el mismo tamaño. Ejemplos de programas de alineación global incluyen NEEDLE (disponible en www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) que es parte del paquete EMBOSS (Rice P et al., 2000, Trends Genet., 16: 276-277.) y el programa GGSEARCH (disponible en fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=compare&pgm=gnw) que forma parte del paquete FASTA (Varita de Pearson Lipman D, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 85: 2444-2448). Ambos programas se basan en el algoritmo Needleman-Wunsch que se utiliza para encontrar la alineación óptima (incluidos los espacios) de dos secuencias a lo largo de toda su longitud. También se puede encontrar una descripción detallada del análisis de secuencia en la Unidad 19.3 de Ausubel et al ("Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, capítulo 15, 1998).

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica el receptor quimérico para antígeno según el primer aspecto de la invención. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico de origen no natural.

En algunas realizaciones del segundo aspecto de la invención, la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54, o codifica una variante funcional de SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54. En algunas realizaciones, la variante funcional incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54.

La molécula de ácido nucleico puede comprender cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o modificado. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede incluir ADN monocatenario y/o bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, ARN monocatenario y bicatenario y ARN que es una mezcla de monocatenarios y bicatenarios. Regiones bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más típicamente, bicatenarios o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, la molécula de ácido nucleico puede comprender regiones de cadena triple que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. La molécula de ácido nucleico también puede comprender una o más bases modificadas o cadenas principales de ADN o ARN modificadas para estabilidad o por otras razones. Se pueden realizar diversas modificaciones en el ADN y el ARN; por tanto, el término "molécula de ácido nucleico" abarca formas modificadas química, enzimática o metabólicamente.

En algunas realizaciones del segundo aspecto de la invención, la molécula de ácido nucleico incluye la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37.

Una persona experta en la técnica entenderá que cualquier secuencia de nucleótidos que codifique un receptor quimérico para antígeno que tenga la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37, o una variante funcional de SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37, está contemplada por la presente invención. Por ejemplo, se contemplan variantes de SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37 que comprenden uno o más ácidos nucleicos diferentes a SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37 pero que todavía codifican secuencias de aminoácidos idénticas. Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos puede codificar cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37 donde una alanina está especificada por un codón, el codón se puede alterar para cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Por consiguiente, cada secuencia de nucleótidos en la presente memoria que codifica un receptor quimérico para antígeno que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37, o una variante funcional de SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37 también describe cada posible variación silenciosa de la secuencia de nucleótidos. Un experto reconocerá que cada codón de un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón de metionina, y TGG, que normalmente es el único codón de triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una construcción de ácido nucleico que incluye una molécula de ácido nucleico según el segundo aspecto de la invención. La construcción de ácido nucleico puede comprender además uno o más de: un origen de replicación para uno o más hospedantes; un gen marcador seleccionable que está activo en uno o más hospedantes; y/o una o más secuencias de control de la transcripción.

Como se usa en la presente memoria, el término "gen marcador seleccionable" incluye cualquier gen que confiera un fenotipo a una célula en la que se expresa, para facilitar la identificación y/o selección de células que se transfectan o transforman con la construcción.

Los "genes marcadores seleccionables" incluyen cualquier secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa por una célula transformada con la construcción, confieren un fenotipo a la célula que facilita la identificación y/o selección de estas células transformadas. Se conocen en la técnica una variedad de secuencias de nucleótidos que codifican marcadores seleccionables adecuados (por ejemplo, Mortesen, RM. y Kingston RE. Curr Protoc. Mol Biol, 2009; Unidad 9.5). Las secuencias de nucleótidos ejemplares que codifican marcadores seleccionables incluyen: gen de la adenosina desaminasa (ADA); Gen de la citosina desaminasa (CDA); Gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR); Gen de la histidinol deshidrogenasa (hisD); Gen de puromicina-N-acetil transferasa (PAC); Gen de la timidina cinasa (TK); Gen de xantina-guanina fosforribosiltransferasa (XGPRT) o genes de resistencia a antibióticos tales como genes de resistencia a ampicilina, genes de resistencia a puromicina, genes de resistencia a bleomicina, genes de resistencia a higromicina, genes de resistencia a kanamicina y gen de resistencia a ampicilina; genes informadores fluorescentes tales como los genes que codifican proteínas fluorescentes verde, rojo, amarillo o azul; y genes indicadores basados en luminiscencia, como el gen de la luciferasa, entre otros, que permiten la selección óptica de células utilizando técnicas como la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Además, debe tenerse en cuenta que el gen marcador seleccionable puede ser un marco de lectura abierto distinto en la construcción o puede expresarse como una proteína de fusión con otro polipéptido (p. ej., el CAR).

Como se estableció anteriormente, la construcción de ácido nucleico también puede comprender una o más secuencias de control de la transcripción. Debe entenderse que el término "secuencia de control de la transcripción" incluye cualquier secuencia de ácido nucleico que efectúe la transcripción de un ácido nucleico conectado operativamente. Una secuencia de control de la transcripción puede incluir, por ejemplo, un líder, una secuencia de poliadenilación, un promotor, un potenciador o una secuencia de activación cadena arriba y un terminador de la transcripción. Típicamente, una secuencia de control de la transcripción incluye al menos un promotor. El término "promotor" como se usa en la presente memoria, describe cualquier ácido nucleico que confiere, activa o mejora la

expresión de un ácido nucleico en una célula.

En algunas realizaciones, al menos una secuencia de control de la transcripción está operativamente conectada a la molécula de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención. Para los propósitos de la presente memoria descriptiva, una secuencia de control de la transcripción se considera "operativamente conectada" a una molécula de ácido nucleico dada cuando la secuencia de control de la transcripción es capaz de promover, inhibir o modular de otro modo la transcripción de la molécula de ácido nucleico. Por tanto, en algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico está bajo el control de una secuencia de control de la transcripción, como un promotor constitutivo o un promotor inducible.

La "construcción de ácido nucleico" puede estar en cualquier forma adecuada, tal como en forma de plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, vector, etc., que es capaz de replicarse cuando se asocia con los elementos de control adecuados y que puede transferir secuencias de genes, contenidas dentro de la construcción, entre células. Por tanto, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores virales. En algunas realizaciones, la construcción de ácido nucleico es un vector. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral.

Un promotor puede regular la expresión de una molécula de ácido nucleico conectada operativamente de forma constitutiva o diferencial con respecto a la célula, tejido u órgano en el que se produce la expresión. Como tal, el promotor puede incluir, por ejemplo, un promotor constitutivo o un promotor inducible. Un "promotor constitutivo" es un promotor que está activo en la mayoría de las condiciones ambientales y fisiológicas. Un "promotor inducible" es un promotor que es activo en condiciones ambientales o fisiológicas específicas. La presente invención contempla el uso de cualquier promotor que sea activo en una célula de interés. Como tal, un experto en la técnica podría determinar fácilmente una amplia gama de promotores.

Los promotores constitutivos de mamíferos pueden incluir, entre otros, virus del simio 40 (SV40), citomegalovirus (CMV), P-actina, ubiquitina C (UBC), factor de elongación 1 alfa (EF1A), fosfoglicerato cinasa (PGK) y potenciador temprano de CMV/actina β de pollo (CAGG).

Los promotores inducibles pueden incluir, pero no se limitan a, promotores químicamente inducibles y promotores físicamente inducibles. Los promotores químicamente inducibles incluyen promotores que tienen actividad regulada por compuestos químicos tales como alcoholes, antibióticos, esteroides, iones metálicos u otros compuestos. Ejemplos de promotores químicamente inducibles incluyen: promotores regulados por tetraciclina (p. ej., ver la patente estadounidense 5.851.796 y la patente estadounidense 5.464.758); promotores sensibles a los esteroides como los promotores del receptor de glucocorticoides (por ejemplo, ver la patente estadounidense 5.512.483), promotores del receptor de ecdisona (por ejemplo, ver la patente estadounidense 6.379.945) y similares; y promotores sensibles a metales tales como promotores de metalotioneína (por ejemplo, ver la patente estadounidense 4.940.661, la patente estadounidense 4.579.821 y US 4.601.978) entre otros.

Como se mencionó anteriormente, las secuencias de control también pueden incluir un terminador. El término "terminador" se refiere a una secuencia de ADN al final de una unidad transcripcional que señala la terminación de la transcripción. Los terminadores son secuencias de ADN no traducidas en 3' que generalmente contienen una señal de poliadenilación, que facilitan la adición de secuencias de poliadenilato al extremo 3' de un transcrito primario. Al igual que con las secuencias promotoras, el terminador puede ser cualquier secuencia terminadora que sea operable en las células, tejidos u órganos en los que se pretende usar. Un experto en la técnica conocerá los terminadores adecuados.

Como se entenderá, la construcción de ácido nucleico del tercer aspecto de la invención puede incluir además secuencias adicionales, por ejemplo, secuencias que permitan una expresión, transporte citoplásmico o de membrana y señales de localización mejorados. Los ejemplos específicos no limitantes incluyen un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES, por sus siglas en inglés).

La presente invención se extiende a todas las construcciones genéticas esencialmente como se describe en la presente memoria. Estas construcciones pueden incluir además secuencias de nucleótidos destinadas al mantenimiento y/o replicación de la construcción genética en eucariotas y/o la integración de la construcción genética o una parte de esta en el genoma de una célula eucariota.

Se conocen en la técnica métodos para la introducción deliberada (transfección/transducción) de material genético exógeno, tal como la construcción de ácido nucleico del tercer aspecto de la presente invención, en células eucariotas. Como se entenderá, el método más adecuado para introducir la construcción de ácido nucleico en la célula hospedante deseada depende de muchos factores, como el tamaño de la construcción de ácido nucleico, el tipo de célula hospedante y la tasa deseada de eficiencia de la transfección/transducción y la viabilidad final deseada, o requerida, de las células transfectadas/transducidas. Los ejemplos no limitantes de tales métodos incluyen; transfección química con productos químicos como polímeros catiónicos, fosfato de calcio o estructuras como liposomas y dendrímeros; métodos no químicos como electroporación, sonoporaciones, choque térmico o transfección óptica; métodos basados en partículas como el suministro por "pistola de genes", magnetofección o impalefección o transducción viral.

La construcción de ácido nucleico se seleccionará dependiendo del método de transfección/transducción deseado. En algunas realizaciones del tercer aspecto de la invención, la construcción de ácido nucleico es un vector viral y el método para introducir la construcción de ácido nucleico en una célula hospedante es la transducción viral. Se conocen

en la técnica métodos para utilizar la transducción viral para provocar la expresión de un CAR en una PBMC (Parker, LL. et al. Hum Gene Ther. 2000; 11: 2377-87) y más generalmente utilizando sistemas retrovirales para la transducción de células de mamíferos (Cepko, C. y Pear, W. Curr Protoc Mol Biol. 2001, unidad 9.9). En otras realizaciones, la construcción de ácido nucleico es un plásmido, un cósmido, un cromosoma artificial o similar, y se puede transfectar en la célula mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una célula modificada genéticamente que incluye el receptor quimérico para antígeno según el primer aspecto de la invención.

En algunas realizaciones del cuarto aspecto de la invención, la célula modificada genéticamente incluye dos o más CAR diferentes.

En un quinto aspecto, la invención proporciona una célula modificada genéticamente que incluye la molécula de ácido nucleico según el segundo aspecto de la invención, o incluye la construcción de ácido nucleico según el tercer aspecto de la invención, o una forma genómica integrada de la construcción de ácido nucleico.

En algunas realizaciones del quinto aspecto de la invención, la célula modificada genéticamente incluye una molécula de ácido nucleico, o una construcción de ácido nucleico, que codifica dos o más CAR diferentes. En algunas realizaciones del quinto aspecto de la invención, la célula modificada genéticamente incluye dos o más moléculas de ácido nucleico, o dos o más construcciones de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica un CAR diferente.

Como se menciona en la presente memoria, una "célula modificada genéticamente" incluye cualquier célula que comprenda una molécula de ácido nucleico o una construcción de ácido nucleico introducida y/o de origen no natural abarcada por la presente invención. La molécula de ácido nucleico introducida o la construcción de ácido nucleico se puede mantener en la célula como una molécula de ADN discreta, o se puede integrar en el ADN genómico de la célula.

El ADN genómico de una célula debe entenderse en su contexto más amplio para incluir todo el ADN endógeno que constituye el complemento genético de una célula. Como tal, debe entenderse que el ADN genómico de una célula incluye cromosomas, ADN mitocondrial y similares. Como tal, el término "integrado genómicamente" contempla la integración cromosómica, la integración del ADN mitocondrial y similares. La "forma genómicamente integrada" de la construcción puede ser todo o parte de la construcción. Sin embargo, en algunas realizaciones, la forma genómicamente integrada de la construcción incluye al menos la molécula de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención.

Como se usa en la presente memoria, el término "CAR diferentes" o "receptores quiméricos para antígenos diferentes" se refiere a dos o más CAR que tienen dominios de reconocimiento de antígeno y/o de señalización no idénticos. En un ejemplo, "diferentes CAR" incluye dos CAR con los mismos dominios de reconocimiento de antígenos (p. ej., ambos CAR pueden reconocer un receptor P2X₇ disfuncional), pero tienen diferentes dominios de señalización, como un CAR que tiene un dominio de señalización con una parte de un receptor de activación y el otro CAR que tiene un dominio de señalización con una parte de un receptor coestimulador. Como se entenderá, al menos uno de los dos o más CAR dentro de esta realización tendrá un dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce el receptor P2X₇ disfuncional y los otros CAR(s) pueden tomar cualquier forma adecuada y pueden dirigirse contra cualquier antígeno adecuado.

Por consiguiente, en algunas realizaciones de los aspectos cuarto y quinto de la invención, los dos o más CAR diferentes tienen dominios de señalización diferentes y pueden tener dominios de reconocimiento de antígenos idénticos o diferentes. Específicamente, la célula modificada genéticamente según el cuarto o quinto aspecto de la invención puede incluir un primer receptor quimérico para antígeno con un dominio de señalización que incluye una porción derivada de un receptor de activación y un segundo receptor quimérico para antígeno con un dominio de señalización que incluye una porción derivada de un receptor coestimulador.

En algunas realizaciones del cuarto o quinto aspecto de la invención, el receptor de activación (del que se deriva una porción del dominio de señalización) es el complejo correceptor CD3 o es un receptor Fc.

En algunas realizaciones del cuarto o quinto aspecto de la invención, el receptor coestimulador (del cual se deriva una porción del dominio de señalización) se selecciona del grupo que consiste en CD27, CD28, CD-30, CD40, DAP10, OX40, 4-1BB (CD137) e ICOS.

En algunas realizaciones del cuarto o quinto aspecto de la invención, el receptor coestimulador (del que se deriva una porción del dominio de señalización) se selecciona del grupo que consiste en CD28, OX40 o 4-1BB.

En algunas realizaciones de los aspectos cuarto y quinto de la invención, la célula modificada genéticamente se modifica adicionalmente para expresar constitutivamente receptores coestimuladores.

Como se describió anteriormente, una respuesta inmunitaria celular típicamente solo se induce cuando se experimentan simultáneamente una señal de activación (típicamente en respuesta a un antígeno) y una señal de coestimulación. Por lo tanto, al tener una célula genéticamente modificada según algunas de las realizaciones anteriores, que incluye dos o más CAR que en combinación proporcionan tanto una señal de activación intracelular como una señal de coestimulación intracelular, se asegura que se pueda inducir una respuesta inmunitaria suficiente

- 5 en respuesta al reconocimiento por el(los) CAR(s) de su antígeno afín. Alternativamente, la célula genéticamente modificada puede incluir solo un CAR, que tiene un dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce un receptor P2X₇ disfuncional, y pueden expresar constitutivamente receptores coestimuladores, aumentando así la probabilidad de que se proporcione coestimulación simultáneamente cuando se activa el CAR. Alternativamente, la célula modificada genéticamente puede modificarse adicionalmente para expresar constitutivamente tanto el receptor o receptores coestimuladores como su ligando o sus ligandos. De esta manera, la célula experimenta continuamente coestimulación y solo necesita la activación de un CAR, con un dominio de señalización que incluye una parte de un receptor de activación, para la activación inmunitaria de la célula.
- 10 Por lo tanto, en algunas realizaciones del cuarto o quinto aspecto de la invención, la célula modificada genéticamente se modifica adicionalmente para expresar constitutivamente receptores coestimuladores. En realizaciones adicionales, la célula genéticamente modificada se modifica adicionalmente para expresar ligandos para los receptores coestimuladores, facilitando así la autoestimulación de la célula. Se conocen en la técnica ejemplos de linfocitos T que expresan CAR que también expresan tanto receptores coestimuladores como sus ligandos afines (para inducir la autoestimulación) e incluyen, *inter alia*, los divulgados en Stephen MT. et al. Nat Med, 2007; 13: 1440-9.
- 15 La potencia de una célula modificada genéticamente que incluye un CAR se puede mejorar modificando adicionalmente la célula para que secrete citocinas, preferiblemente citocinas proinflamatorias o proliferativas. Esta secreción de citocinas proporciona tanto apoyo autocrino para la célula que expresa el CAR como altera el entorno local que rodea a la célula que expresa el CAR de modo que se reclutan y activan otras células del sistema inmunitario. En consecuencia, en algunas realizaciones del cuarto o quinto aspecto de la invención, la célula modificada genéticamente se modifica adicionalmente para secretar citocinas. Esta secreción puede ser constitutiva o puede ser inducible tras el reconocimiento de un CAR de su antígeno afín de ligando.
- 20 Si bien se pueden seleccionar una o más citocinas dependiendo de la respuesta inmunitaria deseada, las citocinas preferidas incluyen IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17 e IL-21, o una combinación de estas.
- 25 La célula modificada genéticamente del cuarto o quinto aspecto de la invención puede ser cualquier célula inmunitaria adecuada, o puede ser una población celular homogénea o heterogénea. En algunas realizaciones, la célula es un leucocito, una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), un linfocito, un linfocito T, un linfocito T CD4+, un linfocito T CD8+, una célula citolítica natural o un linfocito T citolítico natural.
- 30 En un sexto aspecto, la presente invención proporciona una célula modificada genéticamente según la invención para su uso en un método para destruir una célula que expresa un receptor P2X₇ disfuncional, el método que incluye exponer la célula que expresa un receptor P2X₇ disfuncional a la célula genéticamente modificada.
- Por tanto, según el sexto aspecto de la invención, el CAR reconoce directamente el receptor P2X₇ disfuncional.
- 35 Como se usa en la presente memoria, el término "reconoce directamente" incluye la unión directa del dominio de reconocimiento de antígeno del CAR al receptor P2X₇ disfuncional, o un epítipo de este, cuando el receptor está presente en su forma natural. En otro ejemplo no limitante, el dominio de reconocimiento de antígenos puede unirse directamente a una forma procesada del receptor P2X₇ disfuncional, que puede ser presentado por moléculas presentadoras de antígeno como el complejo principal de histocompatibilidad (MHC).
- 40 En algunas realizaciones del sexto aspecto de la invención, la célula que tiene un receptor P2X₇ disfuncional está dentro del cuerpo de un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, el método incluye además exponer la célula que expresa un receptor P2X₇ disfuncional a uno genéticamente modificado junto con una citocina exógena.
- En algunas realizaciones del sexto aspecto de la invención, la célula genéticamente modificada es una célula genéticamente modificada autóloga de la célula que expresa un receptor P2X₇ disfuncional del sujeto.
- 45 En algunas realizaciones del sexto aspecto de la invención, la célula que expresa un receptor P2X₇ disfuncional está dentro del cuerpo de un sujeto. En algunas realizaciones del sexto aspecto de la invención, la célula que expresa un receptor P2X₇ disfuncional es una célula cancerosa.
- En algunas realizaciones del sexto aspecto, la presente invención proporciona una célula modificada genéticamente para su uso en un método de tratamiento o prevención del cáncer en un sujeto, el método incluye proporcionar a un sujeto una célula modificada genéticamente que tiene un receptor quimérico para antígeno, en donde el receptor quimérico para antígeno está dirigido contra una célula diana que tiene un receptor P2X₇ disfuncional.
- 50 Debe entenderse que los términos "tratar", "tratar" o "tratamiento", como se usan en la presente memoria, incluyen dentro de su alcance uno o más de los siguientes resultados: (i) inhibir hasta cierto punto el crecimiento de un tumor primario en un sujeto, incluida la desaceleración y la detención completa del crecimiento, y la reducción del crecimiento del tumor primario después de la resección; (ii) inhibir hasta cierto punto el crecimiento y la formación de uno o más tumores secundarios en un sujeto; (iii) reducir el número de células tumorales en un sujeto; (iv) reducir el tamaño de un tumor en el sujeto; (v) inhibir (es decir, reducir, ralentizar o detener por completo) la infiltración de células tumorales en órganos periféricos; (vi) inhibir (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la metástasis; (vii)
- 55

mejorar la esperanza de vida de un sujeto en comparación con el estado no tratado; (viii) mejorar la calidad de vida de un sujeto en comparación con el estado no tratado; (ix) aliviar, atenuar o mejorar al menos un síntoma de cáncer en un sujeto; (x) provocar la regresión o remisión del cáncer en un sujeto; (xi) aliviar una afección en un sujeto causada por cáncer; y (xii) detener los síntomas en un sujeto que están asociados con el cáncer.

- 5 Los términos "prevenir" o "prevenir" como se usan en la presente memoria deben entenderse que incluyen dentro de su alcance inhibir la formación de un tumor primario en un sujeto, inhibir la formación de uno o más tumores secundarios en un sujeto, o reducir o eliminar la recurrencia del cáncer en un sujeto en remisión.

10 El término "inhibir", como se usa en la presente memoria, significa una disminución o reducción en el crecimiento de un cáncer, una célula cancerosa o un tumor cuando se compara con el crecimiento en un testigo, tal como una célula o un sujeto no tratado. En algunas realizaciones, el crecimiento puede disminuirse o reducirse en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, en relación con un testigo no tratado.

15 La inhibición del crecimiento de un cáncer, un tumor o una célula cancerosa se puede evaluar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, para una célula cancerosa *in vitro*, el crecimiento de la célula puede determinarse mediante un ensayo de proliferación adecuado o mediante un método que evalúe el grado de incorporación de timidina tritiada en el ADN celular durante un período de tiempo determinado. Para un tumor o una célula cancerosa presente *en vivo*, el crecimiento del tumor o la célula puede determinarse, por ejemplo, mediante un método de formación de imágenes adecuado conocido en la técnica.

20 El término "sujeto", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier animal capaz de padecer cáncer. Los temas particulares de interés son los seres humanos y las especies científicamente relevantes como ratones, ratas, hurones, cobayas, hámsteres, primates no humanos, perros, cerdos y ovejas, o animales económicamente relevantes como caballos, perros, gatos y ganado. En una realización preferida del sexto aspecto de la invención, el sujeto es un ser humano.

25 Una referencia a "proporcionar a un sujeto" se refiere a administrar al sujeto la célula modificada genéticamente. Alternativamente, la célula modificada genéticamente se puede generar dentro del sujeto. Por ejemplo, la célula genéticamente modificada puede generarse *en vivo* de manera que el sujeto tenga una población endógena de células modificadas genéticamente. Medios adecuados para tal generación *in vivo* son conocidos en la técnica e incluyen la terapia génica de un sujeto.

30 Como se usa en toda la memoria descriptiva, una referencia a un CAR que se "dirige" contra una célula diana que tiene un receptor P2X₇ disfuncional contempla la orientación selectiva de una respuesta inmunitaria hacia una célula basada en la célula que tiene un receptor P2X₇ disfuncional. Es importante destacar que dicho direccionamiento no se limita al reconocimiento directo del receptor P2X₇ disfuncional por un CAR. Es decir, el CAR en sí mismo no tiene que reconocer ni unirse directamente al receptor P2X₇ disfuncional, sino que simplemente tiene que ser capaz de reconocer selectivamente y ser activado por una célula que expresa un receptor P2X₇ disfuncional.

35 En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona una célula genéticamente modificada para su uso en un método de tratamiento o prevención del cáncer en un sujeto, el método incluye la administración al sujeto de una célula genéticamente modificada según un cuarto o quinto aspecto de la invención.

40 Aunque la provisión de una célula modificada genéticamente que expresa un CAR dirigida contra una célula diana que tiene un receptor P2X₇ disfuncional puede ser suficiente para proporcionar una inmunoterapia eficaz contra células precancerosas o cancerosas, la provisión de adyuvantes junto con las células modificadas genéticamente puede mejorar aún más la inducción de la respuesta inmunitaria y puede aumentar la inmunoterapia. Las citocinas, preferiblemente las citocinas proinflamatorias, son adyuvantes particularmente adecuados para proporcionar a un sujeto junto con células modificadas genéticamente que tienen CAR.

45 Por tanto, en algunas realizaciones de los aspectos sexto y séptimo de la invención, la célula modificada genéticamente se administra al sujeto junto con una citocina. Debe entenderse que, tal como se utiliza en toda la memoria descriptiva, el término "junto con" incluye la célula modificada genéticamente que se administra simultáneamente con una citocina o se administra en combinación con una citocina. En consecuencia, cuando se administra en combinación con una citocina, se puede considerar que incluye una terapia de combinación mediante la cual la inmunoterapia de un sujeto incluye tanto el tratamiento con una citocina como el tratamiento con una célula modificada genéticamente que tiene un CAR dirigido contra una célula diana que expresa un receptor P2X₇ disfuncional. En algunas formas, la citocina se administra en un día diferente (>24 horas) a la administración de las células modificadas genéticamente. En otras formas, la citocina se administra el mismo día (dentro de las 24 horas) que las células modificadas genéticamente. En otras formas, la(s) citocina(s) y la célula genéticamente modificada se administran dentro de las 18 horas, 12 horas, 6 horas, 4 horas, 2 horas, 1 hora, 45 minutos, 30 minutos, 15 minutos, 10 minutos, 5 minutos, 2 minutos o 1 minuto entre sí.

55 Las citocinas adecuadas para la administración junto con la célula modificada genéticamente incluyen IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IFN α , IFN β , IFN γ , GM-CSF, TGF β y TNF α . Las citocinas preferidas incluyen IL-2 e IFN α . Además, las citocinas pueden administrarse como formas recombinantes, formas naturales o mediante sistemas de administración tales como fusiones con proteínas, administradas como una secuencia de ácido

nucleico que se expresa en la célula genéticamente modificada o conjugada con un polímero como polietilenglicol (PEG).

La célula que se va a modificar genéticamente se puede obtener de cualquier fuente adecuada. En algunas realizaciones del sexto o séptimo aspecto de la invención, la célula a modificar genéticamente es una célula autóloga, siendo una célula autóloga de la célula que expresa un receptor P2X₇ disfuncional. De manera ventajosa, una célula autóloga no sería reconocida como "no propia" por el sistema inmunitario del sujeto y, por lo tanto, sería tolerada por el sujeto. Sin embargo, en algunas formas de cáncer, las células autólogas adecuadas pueden no estar fácilmente disponibles. Por tanto, en algunas realizaciones de la invención, la célula que se va a modificar genéticamente es una célula alógena o heteróloga.

La disfunción de P2X₇ es una alteración molecular común en una variedad de cánceres. En consecuencia, el método del sexto o séptimo aspecto de la invención puede usarse para la prevención y el tratamiento de una variedad de cánceres.

En algunas realizaciones del sexto o séptimo aspecto de la invención, el método se usa para la prevención o el tratamiento de un cáncer seleccionado de uno o más de; cáncer de cerebro, cáncer de esófago, cáncer de boca, cáncer de lengua, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cánceres de células epiteliales, cáncer de piel, leucemia, linfoma, mieloma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de testículo. Preferiblemente, el cáncer se selecciona entre uno o más de cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cánceres de vagina, cánceres de células epiteliales, cáncer de piel, cánceres relacionados con la sangre, cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer de útero, cáncer de testículo.

En algunas realizaciones del sexto o séptimo aspecto de la invención, el cáncer es un cáncer metastásico, como el cáncer en estadio III o estadio IV.

Tras la creación de una célula modificada genéticamente según el cuarto o quinto aspecto de la invención, puede ser deseable expandir la población celular *in vitro* para aumentar el número total de células disponibles para su uso en el tratamiento. Esto se puede hacer usando el paso de exponer la célula a un antígeno para el CAR. En consecuencia, en un octavo aspecto, la presente invención proporciona un método de expansión de la célula modificada genéticamente *in vitro* según el cuarto o quinto aspecto de la invención, el método incluye la etapa de exponer la célula a un antígeno para el CAR. En algunas realizaciones, el método incluye el paso adicional de exponer la célula a una citocina.

También se describe un método de expansión *in vitro* la célula modificada genéticamente según el cuarto o quinto aspecto de la invención, el método incluye la etapa de exponer la célula a un antígeno para el CAR y simultáneamente exponer la célula a una citocina.

Las citocinas preferidas utilizadas incluyen miembros de la subfamilia IL-2, la subfamilia del interferón, la subfamilia IL-10, la subfamilia IL-1, la subfamilia IL-17 o la subfamilia TGF- β . En algunas realizaciones del octavo o noveno aspectos de la invención, la citocina se selecciona del grupo que consiste en IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, TNF- α , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 y GM-CSF, o una combinación de estos.

Se describe además un método de expansión *in vitro* de la célula modificada genéticamente según el cuarto o quinto aspecto de la invención, el método incluye exponer la célula a anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 inmovilizados. En algunas realizaciones del décimo aspecto de la invención, los anticuerpos se inmovilizan sobre un sustrato con perlas (por ejemplo, Dynabeads™ "activadoras humanas"). Los anticuerpos pueden inmovilizarse en una superficie alternativa, como la superficie de un recipiente de cultivo de tejidos, un matraz de cultivo, una placa o un biorreactor.

Como entendería un experto en la técnica, dependiendo del dominio de señalización del CAR, el reconocimiento por el CAR de su antígeno afín conducirá a una señalización intracelular que finalmente puede conducir a la proliferación celular. En consecuencia, se pueden expandir pequeñas cantidades de células, o incluso células individuales, (o en el caso de una sola célula, expandirse clonalmente) para formar cantidades terapéuticamente significativas. Este proceso se puede mejorar aún más mediante la provisión de citocinas.

El suministro o administración de la célula modificada genéticamente según un cuarto o quinto aspecto de la invención puede ser el suministro o administración de la célula sola, o el suministro o administración de la célula formulada en una composición farmacéutica adecuada. Por consiguiente, en un octavo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que incluye una célula modificada genéticamente según un cuarto o quinto aspecto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se conocen métodos en la técnica para proporcionar células que contienen CAR para inmunoterapia (ver por ejemplo Kershaw, MH. et al. Clin Cancer Res. 2006; 12 (20): 6106-15; Parker LL. et al. Hum Gene Ther 2000; 11: 2337-87). Además, se conocen en la técnica protocolos y métodos para la preparación, expansión y evaluación de células que expresan CAR de mamíferos (ver por ejemplo Cheadle, EJ. et al. Antibody Engineering: Methods and Protocols, segunda edición, Methods in Molecular Biology, tomo 907: 645-66) y se resumen en los ejemplos siguientes.

La composición farmacéutica también puede incluir uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables, incluidas sales, aminoácidos, polipéptidos, polímeros, disolventes, tampones, excipientes y agentes de carga farmacéuticamente

aceptables, teniendo en cuenta las características físicas y químicas particulares de la célula a administrar. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica incluye una suspensión de células modificadas genéticamente según el cuarto o quinto aspecto de la invención en un medio adecuado, tal como disolución salina isotónica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede incluir adyuvantes adecuados tales como una o más citocinas como se describió anteriormente. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica también puede incluir un intermediario como se describió anteriormente.

La administración de la composición farmacéutica también puede ser por medios parenterales que incluyen inyección intravenosa, intraventricular, intraperitoneal, intramuscular o intracraneal, o inyecciones locales en el sitio de un tumor o masa cancerosa.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros establecidos, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

Finalmente, se hace referencia a libros de texto estándar de biología molecular que contienen métodos para llevar a cabo técnicas básicas abarcadas por la presente invención. Ver, por ejemplo, Green MR y Sambrook J, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4a edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

Resultará evidente para el experto en la técnica que, si bien la invención se ha descrito con cierto detalle para fines de claridad y comprensión, se pueden realizar diversas modificaciones y alteraciones a las realizaciones y métodos descritos en la presente memoria sin apartarse del alcance del concepto inventivo descrito en esta memoria descriptiva.

La invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos. Los ejemplos tienen el propósito de describir realizaciones particulares solamente y no pretenden ser limitantes con respecto a la descripción anterior.

Ejemplo 1

Protocolo para el diseño y expresión del receptor quimérico para antígeno (CAR) del péptido de unión a PEP2-2-3

Un protocolo ejemplificado que detalla el proceso de diseño y expresión de un CAR receptor anti-P2X₇ disfuncional (nf) según una realización de la presente invención se detalla a continuación.

Diseño de receptor quimérico para antígeno (anti-P2X₇ nf) PEP2-2-3

Se diseñó un receptor quimérico para antígeno anti-P2X₇ nf (CAR) según el esquema ilustrado en la Figura 1.

Se generó un dominio de reconocimiento de antígeno **1** del CAR que incluía la secuencia de aminoácidos del péptido de unión PEP2-2-3 (secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 10 y secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 11). Se demostró que la secuencia PEP2-2-3 tiene una afinidad específica por el receptor P2X₇ disfuncional expresado en células cancerosas, como las células LNCap de próstata, sin una afinidad significativa por los monocitos o linfocitos.

Un péptido de señalización CD8a **2** (que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 12 y la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 13) se unió al extremo N-terminal del dominio de reconocimiento de antígeno PEP2-2-3 **1**. El péptido de señalización CD8a **2** incluye una secuencia consenso de Kozak en las posiciones 1 a 13 de SEQ ID NO: 13. El péptido de señalización CD8a **2**, incluida la secuencia de Kozak, actúa para facilitar el reconocimiento del ARN transcrito por el ribosoma y proporciona un sitio de inicio de la traducción, promoviendo así la traducción de la secuencia de ARN transcrito del CAR a una proteína.

El dominio de reconocimiento de antígeno **1** del CAR estaba vinculado a un dominio transmembrana **3** a través de una de las dos regiones de bisagra, denominada bisagra larga **4** y bisagra corta **5**. La provisión de una bisagra larga **4** permite la flexibilidad del dominio de reconocimiento de antígeno que puede ser necesario para que el dominio de reconocimiento de antígeno interactúe con su ligando análogo (P2X₇ disfuncional). Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la bisagra larga **4** se establecen en SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la bisagra corta **5** se establecen en SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17, respectivamente.

El dominio transmembrana **3**, y una porción del dominio intracelular **6**, del CAR es proporcionado por una porción del receptor coestimulador CD28 **7** (secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 18 y secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 19). El dominio intracelular incluye además una porción del receptor coestimulador OX40 **8** (secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 20 y secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 21) y una porción del receptor de activación CD3 zeta **9** (secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 22 y secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 23).

Una secuencia P2A **10** (secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 24 y secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 25) se añadió al extremo C-terminal del CAR, permitiendo la escisión posterior a la traducción de cualquier secuencia peptídica unida al extremo C del CAR. La secuencia de aminoácidos para el CAR anti-P2X₇ nf-bisagra larga y el CAR anti-P2X₇ nf-bisagra corta se establecen en las SEQ ID NO: 26 y 27, respectivamente.

Diseño y ensamblaje del vector Lentival

5 Los CAR diseñados se incorporaron al plásmido lentiviral BLIV (System Biosciences, California, EE. UU.) ilustrado en la Figura 2, que incluye las proteínas informadoras de fluorescencia y bioluminiscencia, la proteína de fluorescencia verde (GFP) y la luciferasa de luciérnaga (FLuc). El plásmido BLIV incluye además una secuencia codificante de T2A entre las secuencias codificantes de la proteína indicadora de GFP y FLuc que permite la separación posterior a la traducción de las proteínas FLuc y GFP.

10 Se agregaron secuencias que tienen homología con las secuencias anteriores y posteriores al sitio de restricción *NheI* del vector BLIV a los extremos 5' y 3' de los CAR diseñados para dar como resultado las secuencias de nucleótidos finales establecidas en SEQ ID NO 28 (CAR-bisagra larga) y SEQ ID NO: 29 (CAR-bisagra corta). La inclusión de las secuencias 5' y 3' permitió la incorporación del CAR anti-P2X₇ nf en el vector BLIV usando clonación de Gibson.

La secuencia de nucleótidos para el CAR anti-P2X₇ nf-bisagra larga y CAR anti-P2X₇ nf-bisagra corta se construyeron utilizando tecnología de bloques génicos (gBlock™ Gene Fragments - Integrated DNA Technologies, Iowa, EE. UU.) y se ensamblaron con el kit de clonación de ensamblaje Gibson (New England Biolabs inc. Ipswich MA, EE. UU. – núm. de cat. E5510S) según las instrucciones del fabricante.

15 El plásmido BLIV se restringió en el sitio de clonación *NheI* y la secuencia codificante del CAR anti-P2X₇ nf se incorporó usando ensamblaje de Gibson.

Clonación y evaluación del vector BLIV-CAR

Se transformaron células de *E. coli* competentes 5-alfa de New England Biolabs (provistas en el kit de clonación de ensamblaje Gibson) con los vectores BLIV-CAR generados según las instrucciones del fabricante. Brevemente:

- 20
- Un tubo de células de *E. coli* competentes 5-alfa de NEB se descongeló en hielo durante 10 minutos;
 - Se añadieron 1-5 µl que contenían 1 pg - 100 ng de ADN plasmídico BLIV-CAR a la mezcla de células y se mezclaron agitando el tubo de 4 a 5 veces;
 - La mezcla de *E. coli* y plásmido se colocó en hielo durante 30 minutos sin mezclar;
 - La mezcla de células y plásmido se sometió a choque térmico a 42 °C durante 30 segundos antes de colocarla en hielo durante 5 minutos sin mezclar;
 - Se añadieron 950 µl de SOC a la mezcla antes de calentarla a 37 °C durante 60 minutos y agitar vigorosamente;
 - Se prepararon placas de selección y se calentaron hasta 37 °C;
 - Se prepararon diluciones seriadas de 10 veces de las células en disolución SOC; y
 - Se extendieron 50 a 100 µl de cada dilución en placas de selección seguido de incubación durante la noche a 37 °C.

25

30 Tras la incubación de las células transformadas (*E. coli*), se aislaron 10 colonias de bacterias transformadas con el plásmido BLIV-CAR-bisagra corta y 10 colonias de bacterias transformadas con el plásmido BLIV-CAR-bisagra larga, se purificó el ADN del plásmido y se restringió con una enzima de restricción *Bam*HI. El ADN restringido se analizó mediante electroforesis en gel en busca de fragmentos de restricción de tamaño apropiado. Como se muestra en la Figura 3, las colonias 2 a 9 de los clones bacterianos transformados con el plásmido de BLIV-CAR-bisagra larga contenían los fragmentos de restricción de tamaño apropiado (7,8 kb y 2,8 kb), mientras que solo la colonia 4 de los clones bacterianos transformados con el BLIV-CAR-bisagra corta proporcionó los fragmentos de restricción de tamaño apropiado (7,4 kb y 2,8 kb).

35

40 Los clones 2 a 4 de las bacterias que contienen el plásmido BLIV-CAR-bisagra larga (L2 a L4) y el clon 4 de las bacterias que contienen el plásmido BLIV-CAR-bisagra corta (S4) se seleccionaron para una confirmación adicional de la identidad del plásmido usando las enzimas de restricción *Eco*RI, *Bam*HI y *Pst*I. Todas las colonias mostraron fragmentos de restricción de la longitud esperada, como se establece en la Tabla 4 y la Figura 4.

Tabla 4

Longitud esperada del fragmento de restricción de los plásmidos BLIV-CAR

Enzima de restricción y plásmido	Longitud esperada
Plásmido BLIV sin modificar	8,9kb
BLIV-CAR-bisagra larga con restricción con Bam HI	7,8kb y 2,8 kb
BLIV-CAR-bisagra corta con restricción con Bam HI	7,4kb y 2,8 kb

Enzima de restricción y plásmido	Longitud esperada
BLIV-CAR-bisagra larga con restricción con Eco RI	6,8kb, 2,6 kb y 1,5 kb
BLIV-CAR-bisagra corta con restricción con Eco RI	7,7kb y 2,6kb
BLIV-CAR-bisagra larga con restricción con Pst I	8,6kb, 2,0 kb y 0,22 kb
BLIV-CAR-bisagra corta con restricción con Pst I	9,3kb, 0,8 kb y 0,22 kb

Construcción y verificación de vectores lentivirales

Se usaron células 293T para empaquetar lentivirus a partir de un protocolo de 3 plásmidos según el siguiente método.

5 **Día 1:** Se sembraron células 293T en 35 ml de medio DMEM con suero al 10 % en un matraz T-225 de manera que las células fueran 90-95 % confluentes al día siguiente.

Día 2: Se añadieron 30 ug de uno de los plásmidos BLIV-CAR generados (o un plásmido BLIV sin modificar), 30 ug de plásmido gag-pol delta 8.2 y 15ug de plásmido VSV-G (pMD2.G), a medios OptiMEM hasta un volumen final de 750 ul y se mezclaron. Se añadieron 300 ul de disolución de PEI y se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 20 minutos. Después, la mezcla se añadió a las células 293T confluentes antes de la incubación a 37 °C.

10 **Día 3:** Se decantó el sobrenadante de las células 293T 24 horas después de la adición de la mezcla de plásmidos y se almacenó a 4 °C. La mezcla decantada se reemplazó con 35 ml de medios frescos antes de una incubación adicional a 37 °C.

15 **Día 4:** 48 horas después de la adición de la mezcla de plásmidos, se eliminaron los medios y se combinó con el sobrenadante de la recolección de 24 horas. Los sobrenadantes combinados se centrifugaron durante 15 minutos a 1500 g para eliminar cualquier residuo celular restante. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y luego se centrifugó a 17.000 rpm en una ultracentrífuga WX durante una hora. Después de la centrifugación, el sobrenadante se decantó a mano, donde quedaron 50-200 ul en el tubo. El tubo de centrifuga se colocó en un tubo con tapón de rosca de 50 ml para evitar la contaminación y la evaporación y se dejó que el virus se resuspendiera a 4°C durante la noche.

20 **Día 5:** El virus se resuspendió del fondo del tubo de centrifuga y se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml. El virus resuspendido se centrifugó durante 5 minutos en un tubo de microcentrífuga a 5000 rpm para eliminar cualquier residuo restante.

25 La transfección de células 293T con el vector BLIV-CAR-bisagra corta y BLIV-CAR-bisagra larga se evaluó después de 24 horas de incubación por la presencia de fluorescencia de GFP (ver Figura 5A y Figura 6A). El sobrenadante recogido el día 5 (como se indica anteriormente) que contenía vectores de lentivirus BLIV-CAR de bisagra corta y larga se incubó con células 293T frescas y se visualizó la fluorescencia de GFP para probar la capacidad de transducción (ver Figura 5B y Figura 6B).

Detección de la función de los linfocitos T CAR

30 Se aislaron 10^8 linfocitos T CD8 de 50 ml de sangre humana usando el kit de aislamiento de linfocitos T CD8+ humanos RosetteSep™ (Stemcell Technologies, Vancouver, Canadá) según las instrucciones del fabricante. El análisis de la pureza, como se ilustra en la Figura 7, demostró que el 76,6 % de las células purificadas eran CD8+

35 Los linfocitos T CD8+ se incubaron a 10^5 células por pocillo con una proporción de 1: 1 de perlas de expansor de linfocitos T dinámicas (CD3/CD28). A continuación, las células CD8 se incubaron durante la noche junto con preparaciones lentivirales, a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 o mayor, que contenían plásmidos BLIV sin modificar, plásmidos BLIV-CAR-bisagra corta o plásmidos BLIV-CAR-bisagra larga. Después de la incubación, los linfocitos T CD8+ se lavaron antes de ser cocultivados con las células diana.

Las células diana que expresan el receptor P2X₇ disfuncional fueron proporcionados por la línea celular de cáncer de mama BT549 (ATCC HTB-122). Estas células se marcaron con tinte usando el tinte intercalante de membrana fluorescente eFluor™ 670 (affymetrix eBioscience) según las instrucciones del fabricante. Brevemente:

- 40
- Se prepararon células BT549 como una suspensión unicelular y se lavaron en PBS dos veces para eliminar cualquier suero residual;
 - Las células se resuspendieron en PBS a temperatura ambiente;
 - Se preparó una disolución 10 µM de tinte de proliferación celular eFluor® 670 en PBS a temperatura ambiente;
 - Se añadió un volumen igual de la disolución de tinte 10 µM a las células BT549 preparadas para dar una

concentración final de disolución de tinte 5 μ M;

- Las células BT549 en la disolución de tinte se incubaron durante 10 minutos a 37 ° C en la oscuridad, antes de que se detuviera el marcaje al añadir 4 veces el volumen de medio de cultivo frío que contenía suero al 10 % seguido de incubación en hielo durante 5 minutos en la oscuridad;
- 5 • Finalmente, las células se lavaron 3 veces en medio de cultivo antes de resuspenderlas en medio de cultivo a la concentración deseada.

Después del marcaje con tinte, las células diana se cocultivaron con los linfocitos T CD8+ preparadas en proporciones de 10: 1, 5: 1, 1: 1 y 0: 1 (linfocitos T: dianas).

10 Después de 24 horas de cocultivo, las células se recogieron y analizaron usando clasificación de células activada por fluorescencia (FACS). Se cuantificó el número de células diana que contenían el tinte intercalante de membrana para evaluar si los linfocitos T cocultivados conducían a la muerte de las células diana o la detención de la proliferación celular. La estrategia de activación y análisis usada para cuantificar la eficacia de los linfocitos T CD8+ para matar células diana se ilustra en la Figura 8 y se cuantifica en la Figura 9. La Figura 8A ilustra el análisis de histograma y activación de los linfocitos T CD8+ marcados. La Figura 8B ilustra el análisis de histograma y de activación de las células diana BT549 marcadas. La Figura 8C ilustra el análisis de histograma y de activación después de 24 horas de cocultivo de linfocitos T CD8+ testigo y dianas BT549. La Figura 8D ilustra el análisis de histograma y de activación después de 24 horas de cocultivo de linfocitos T CD8+ transducidos con BLIV-CAR-bisagra larga y células diana BT549. La Figura 8E ilustra el análisis de histograma y de activación del cocultivo de 24 horas de linfocitos T CD8+ transducidos con BLIC-CAR-bisagra corta y células diana BT549.

20 Como puede verse en la Figura 9, hubo un aumento en el número de células diana BT549 eliminadas (muertas) cuando las células diana se cocultivaron con linfocitos T CD8 transducidos con lentivirus que contenían BLIV-CAR-bisagra larga o BLIV-CAR-bisagra corta, en comparación con el cocultivo de las células diana con linfocitos T CD8 no transducidos o transducidos testigo (vector BLIV no modificado).

25 En vista de los resultados presentados en la Figura 9, es evidente que los linfocitos T CD8+ transducidos con CAR anti-receptores P2X₇ nf (que tienen la bisagra corta o larga) demuestran niveles elevados de actividad citotóxica hacia células diana que expresan P2X₇ disfuncional, lo que demuestra la capacidad de los linfocitos T CAR para destruir las células cancerosas diana.

Ejemplo 2

Diseño de un receptor quimérico para antígeno anti-P2X₇ n alternativo

30 Otro protocolo ejemplificado que detalla el proceso de diseñar y expresar en un linfocito T, un CAR anti-receptor P2X₇ disfuncional (nf), según una realización de la presente invención, se detalla a continuación.

35 Se diseñaron CAR anti-P2X₇ nf utilizando tres péptidos de unión anti-P2X₇ disfuncionales. Específicamente, los CAR se diseñaron para incluir dominios de reconocimiento de antígeno con homología de secuencia con los péptidos PEP2-2-1-1, PEP2-472-2 o PEP2-2-12 (que tienen las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 32, 33 y 34, respectivamente). Se ha demostrado que estos péptidos de unión se unen al receptor P2X₇ disfuncional (Barden, J.A., Sluyter, R., Gu, B.J. y Wiley, J.S. 2003. Specific detection of non-functional human P2X₇ receptors in HEK293 cells and B-lymphocytes. FEBS Lett 538, 159-162).

40 El alineamiento de los péptidos de unión anteriores a las regiones variables de la cadena pesada de los anticuerpos que reconocen receptores P2X₇ disfuncionales se muestra en la Figura 10. El alineamiento de las secuencias de la región determinante de complementariedad (CDR 1 a 3) se indica mediante recuadros.

A continuación, se detalla un ejemplo específico de la construcción de un CAR que tiene la secuencia PEP2-2-1-1. Se usaron la misma estructura y secuencias de CAR para los CAR que tenían secuencias PEP2-472-2 o PEP2-2-12 como péptidos de unión, con los péptidos de unión alternativos sustituidos por PEP2-2-1-1.

45 Las secuencias de ADN que codifican el péptido de unión a PEP2-2-1-1 se sintetizaron dentro del marco con otras secuencias de ADN para generar un CAR que tiene la configuración que se describe a continuación.

50 Con referencia a la Figura 11, se preparó un dominio de reconocimiento de antígeno al enlazar una secuencia líder de la variante 1 del transcrito de la molécula CD8a de Homo sapiens (CD8A) (que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEC ID NO: 30 y la secuencia de nucleótidos establecida en la SEC. ID NO: 31) **11** al extremo N del péptido de unión PEP2-2-1-1 **12** (que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 32 y la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 35).

El dominio de reconocimiento de antígeno se unió luego a un dominio transmembrana a través de una bisagra de IgG4 -CH2-CH4 modificada **13** que tiene la secuencia de la bisagra larga como se indica en el Ejemplo 1 anterior (es decir, la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 14 y la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 15).

El dominio extracelular que comprende la secuencia líder de CD8 **11** y el péptido de unión PEP2-2-1 **12** se enlazó a un dominio transmembrana **14** proporcionado por una porción de CD28 humano **15** (que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 18 y la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 19) que también incluía una parte de los dominios citoplásmicos de CD28 **16**.

- 5 La porción intracelular del CAR **17** fue proporcionada por una porción de la molécula de CD28 humana mencionada anteriormente **14** y el dominio citoplásmico del miembro 4 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral de Homo sapiens (TNFRSF4/OX40 - que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 20 y la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 21) **18** vinculado al dominio citoplasmático de la molécula CD247 de Homo sapiens **19** (cadena zeta de la glicoproteína CD3 de la superficie de linfocitos T, que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 22 y la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 23).

Diseño y ensamblaje del vector Lentival

- 15 Las secuencias de nucleótidos para los CAR diseñados PEP2-2-1-1, PEP2-472-2 y PEP2-2-12 se construyeron utilizando tecnología de bloques génicos (gBlock™ Gene Fragments - Integrated DNA Technologies, Iowa, EE. UU.) y se ensamblaron utilizando el kit de clonación de ensamblaje Gibson (New England Biolabs inc. Ipswich MA, EE. UU. - núm. de cat. E5510S) según las instrucciones del fabricante. Las secuencias de las construcciones de nucleótidos para los CAR PEP2-2-1-1, PEP2-472-2 o PEP2-2-12 para la integración en vectores de clonación (incluidos los sitios de restricción) se establecen en las SEQ ID NO: 35, 36 y 37, respectivamente.

- 20 Las construcciones de nucleótidos CAR se incorporaron en el vector pCDH-CMV-MCS-T2A (pCDH) (System Biosciences, California, EE. UU. núm. de cat. CD524A-1) ilustrado en la Figura 11, que incluye la proteína informadora de fluorescencia, proteína de fluorescencia verde (GFP). El vector pCDH incluye además una secuencia codificante de T2A entre el sitio de clonación y la GFP que permite la separación posterior a la traducción de las proteínas CAR y GFP clonadas.

- 25 Para la integración de las construcciones de nucleótidos CAR PEP2-2-12 y PEP2-472-2 en el vector pCDG, el vector pCDH se restringió con *EcoRI* y *NotI* y gel purificado (kit de extracción de gel QIAquick, QIAGEN). Las construcciones de gBlock de nucleótidos CAR PEP2-2-12 y PEP2-472-2 también se digirieron con enzimas de digestión *EcoRI* y *NotI*. El fragmento de gBlock restringido se purificó luego con un kit de purificación de PCR QIAquick según las instrucciones del fabricante. El vector restringido se ligó con las construcciones CAR restringidas en una relación molar entre inserto y vector de 3:1. Las mezclas de ligación se transformaron en células SURE2 químicamente competentes (Agilent).

- 30 La construcción CAR PEP2-2-1-1 contenía un sitio de restricción *EcoRI* y, por lo tanto, se integró en el vector pCDH de una manera diferente a las construcciones de nucleótidos CAR PEP2-2-12 y PEP2-472-2. El vector pCDH se restringió con *EcoRI*, y la prolongación hacia 5' resultante se rellenó mediante ADN polimerasa de T4 en presencia de dNTP 100 uM (12 °C durante 15 minutos). Se terminó la reacción (75 °C durante 20 minutos en presencia de EDTA 10 mM) y el vector restringido se purificó en columna (kit de purificación QIAquick PCR, QIAGEN). A continuación, el vector purificado se restringió más con *NotI* y gel purificado (kit de extracción de gel QIAquick, QIAGEN). El fragmento de construcción CAR PEP2-2-1-1 se restringió primero con *SmaI* seguido por digestión con *NotI* (ambos a 25 °C). El fragmento de gBlock restringido se purificó con un kit de purificación QIAquick PCR según las instrucciones del fabricante. El vector restringido se ligó con la construcción CAR en una proporción molar entre inserto y vector de 3:1.

Clonación y evaluación del vector pCDH-CAR

- 40 Las mezclas de ligación para cada una de las tres construcciones CAR descritas anteriormente se transformaron en células SURE2 químicas competentes (Agilent) según las instrucciones del fabricante. Brevemente:

- Las células SURE2 se descongelaron en hielo. Una vez descongeladas, las células se mezclaron suavemente y se colocaron alícuotas de 100 µl de células en tubos de fondo redondo de 14 ml previamente enfriados;
- Se añadieron 2 µl de β-mercaptoetanol a cada alícuota de células;
- Los tubos se mezclaron y se incubaron en hielo durante 10 minutos, agitando suavemente cada 2 minutos;
- 45 • Se añadieron 0,1-50 ng de cada uno de los vectores pCDH-CAR a una alícuota de células;
- Las alícuotas se mezclaron suavemente, luego se incubaron en hielo durante 30 minutos;
- Los tubos se sometieron a pulsos de calor a 42 °C en un baño de agua durante 30 segundos y luego se incubaron en hielo durante 2 minutos;
- 50 • Se añadieron 0,9 ml de caldo NZY+ precalentado (42 °C) a cada tubo seguido de incubación a 37 °C durante 1 hora con agitación a 225-250 rpm;
- Se sembraron hasta 200 µl de la mezcla de transformación en placas de agar LB que contenían antibiótico, seguido de incubación a 37 °C durante la noche;

- Las colonias se recogieron y cultivaron durante la noche;
- El ADN plasmídico se aisló de los clones cultivados con un kit miniprep Quicklyse (QIAGEN) y se digirió con digestión de *EcoRI/Not I* para identificar clones con los vectores CAR-pCDH de tamaño correcto

5 Después de la incubación de las células transformadas (SURE2), se aislaron de 5 a 6 colonias de células transformadas con pCDH-CAR para cada uno de los péptidos de unión PEP2-2-1-1, PEP2-472-2 o PEP2-2-12 y posteriormente se incubaron durante la noche. El ADN plasmídico se aisló con un kit miniprep Quicklyse (QIAGEN) a partir de cada una de las colonias cultivadas y se restringió con las enzimas de restricción *EcoRI/Not I*. El ADN restringido se analizó mediante electroforesis en gel en busca de fragmentos de restricción de tamaño apropiado.

10 Como se muestra en la Figura 13, la colonia 3 de la construcción PEP2-2-1-1 pCDH-CAR, las colonias 1 y 3 de la construcción PEP2-472-2 pCDH-CAR y las colonias 1, 3 y 5 de la construcción PEP2-2-12 pCDH-CAR contenían los fragmentos de restricción de tamaño apropiado.

Cada clon seleccionado se secuenció para confirmar la integración del CAR al usar los cebadores apropiados seleccionados de la Tabla 5.

Tabla 5

15 **Cebadores utilizados para la confirmación de la construcción CAR correcta en colonias seleccionadas**

Nombre del cebador	Secuencia	SEC ID NO
pCHD-CMV-Dir	GGTGGGAGGTCTATATAAGC	SEC ID NO: 38
pCHD-coGFP-Inv	TGATGCGGCACTCGATCTC	SEC ID NO: 39
2-2-1-1-Inv	CTTCACGGAGTCTGCGTAG	SEC ID NO: 40
2-2-1-1-Dir	TCTTGTCAGTGTATCCAGTG	SEC ID NO: 41
2-472-2-Inv	CGTATCTTCAGCTCTCAAGC	SEC ID NO: 42
2-472-2-Dir	TGGTCCTTCAGTTTTCTGT	SEC ID NO: 43
2-12-2-Inv	CAGCTGTATCTTCTGCTC	SEC ID NO: 44
Com-For-1	AGTGGGAGAGTAACGGACAG	SEC ID NO: 45
Com-For-2	AGGGCCAGAATCAATTGTAC	SEC ID NO: 46

20 Los datos de secuenciación de cada colonia seleccionada se alinearon con el clon recombinante derivado *in silico* para cada una de las construcciones CAR de PEP2-2-1-1, PEP2-472-2 o PEP2-2-12 y se verificaron las construcciones apropiadas para al menos una de cada una de las colonias seleccionadas. El aislamiento de plásmido libre de endotoxinas a gran escala de los clones verificados se realizó con un kit NucleoBond® Xtra Midi EF, Macherey-Nagel según las instrucciones del fabricante.

Construcción y verificación de vectores virales

25 El empaquetamiento de lentivirus se realizó en células Hek293T transfectadas de forma transitoria utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según un protocolo de laboratorio estándar (Brown, C.Y. et al. 2010. Robust, reversible gene knockdown using a single lentiviral short hairpin RNA vector. Hum Gene Ther 21, 1005-1017). Brevemente:

- Se mezclaron 12,5 ug de ADN del vector lentiviral con 3,75 ug de pMD2.g (vector de expresión de la envoltura de VSV-G), 6,25 ug de pRSV-Rev y 7,5 ug de pCMVdelta8.2 por transfección en un matraz T75cm usando 75 ul de Lipofectin según el protocolo del fabricante y se incubaron durante la noche;
- Se cambiaron los medios la mañana siguiente y se recogió el sobrenadante que contenía virus 48 horas después;
- Los sobrenadantes recolectados se centrifugaron a 300 xg durante 5 minutos antes de filtrarlos a través de un filtro de 0,45 µm;
- Las partículas de virus de los sobrenadantes filtrados se concentraron mediante ultracentrifugación (68.000 xg durante 90 minutos y 4 °C, rotor Beckman SW32). Se eliminó el sobrenadante y el sedimento de virus se resuspendió suavemente en DMEM sobre hielo;
- Se almacenaron alícuotas de 100 ul de virus -70 °C hasta que se necesitaron.

Para evaluar la tasa de transfección del virus, se recolectaron células Hek293T transfectadas y se determinó el

porcentaje de células positivas para GFP (células que contienen el vector pCDH) mediante citometría de flujo. En la Figura 14 se muestran resultados representativos para Hek293T transfectadas con la mezcla de empaquetamiento LV-PEP2-472-2.

5 Los títulos virales se calcularon por transducción de un número conocido de células Hek293T con diluciones en serie (1:50 y 1: 100) de disolución madre concentrada de LV. Las transducciones se realizaron durante la noche en presencia de polibreno (bromuro de hexadimetrina) 8 ug/ml. Al día siguiente, los medios que contenían virus y polibreno se reemplazaron con medios frescos, las células se recogieron 24 horas después y se determinó el porcentaje de células positivas para GFP mediante citometría de flujo. Los títulos virales se calcularon utilizando la fórmula: unidades de transducción/ml (TU) = (FxC/V)xD donde F = frecuencia de células GFP+ (% de GFP +/100), C = número de células en el momento de la adición del virus, V = volumen de transducción en mL y D = factor de dilución. Los datos de flujo representativos para la transducción de LV-PEP2-472-2 se muestran en la Figura 15. La TU para cada uno de los vectores virales PEP2-2-1-1, PEP2-12-2 y PEP2-472-2 CAR se proporciona en el Tabla 6 a continuación.

Tabla 6

15 **Unidades de transducción para vectores virales**

Construcción lentiviral	Factor de dilución	% promedio de células GFP+	TU/ml
PEP2-2-1-1	50	31,15	4,14e6
	100	21,25	5,62e6
PEP2-12-2	50	54,6	7,26e6
	100	33,15	8,82e6
PEP2-472-2	50	62	8,25e6
	100	39,55	10,52e6

Detección de función de linfocito T CAR P2X₇ nf

Producción de linfocitos T CD8 que expresan CAR anti-P2X₇ nf

Las células CD8 humanas se purificaron y transdujeron según el siguiente método:

20 Se purificaron linfocitos T CD8 humanos a partir de células mononucleares (MNC, por sus siglas en inglés) aisladas de capa leucoplaquetaria de donantes anónimos (servicio de sangre de la Cruz Roja de Australia). Las MNC se aislaron usando medios de gradiente de densidad Ficoll-Paque™. Los linfocitos T CD8 se purificaron a partir de MCN con el kit de linfocitos T CD8 humanos Dynabeads® Untouched™ (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. La pureza de las células aisladas, evaluada por citometría de flujo, fue ≥85 %.

25 Se preincubaron 2x10⁶ células purificadas con perlas CD3/CD28 (proporción entre perlas y células 3:1) e IL2 (500 U/ml) durante 30 minutos antes de la adición de 1 a 2 unidades de multiplicidad de infección (MOI) de virus que contienen LV- PEP2-2-1-1, LV-PEP2-472-2 o un vector de LV vacío (virus de control de GFP) junto con polibreno 8ug/ml. Las células se incubaron con virus durante 16 horas antes de eliminar los medios que contenían virus. Las células y perlas restantes se incubaron en medios frescos que incluían IL2 durante 40 horas antes de que se analizaran los niveles de fluorescencia de GFP.

30 Como se ilustra en la Figura 16, entre el 8 % y el 43 % de las células CD8 GFP+ indica una transducción exitosa.

Producción de células diana que expresan receptores P2X₇ nf o P2X₇ naturales (WT)

35 Para evaluar la eficacia de las células CD8 que expresan los CAR anti-P2X₇ nf, se prepararon células Hek293T que sobreexpresan un receptor P2X₇ disfuncional (que tiene una mutación K193A) o un dominio extracelular natural del receptor P2X₇ en su superficie celular.

40 Se solicitaron a Integrated DNA Technologies (IDT) fragmentos de gen gBlock EXD2_K193A (P2X₇ nf) y EXD2_WT (P2X₇ funcional (SEQ ID NO: 47 y 48, respectivamente). Los dominios EXD2 se diseñaron para expresarse dentro del marco con secuencias de ADN que codifican una proteína de fusión que consiste en IgK-líder-HA-MYC-PDGFR-dominio transmembrana de pDisplay (Invitrogen - Figura 17). Estas proteínas de fusión se diseñaron para la expresión superficial. Los fragmentos de genes EXD2_K193A y EXD2_WT se clonaron entre las etiquetas de epítipo HA y MYC para formar bloques génicos de fusión. Las secuencias de entrada attB1 y attB2 se incluyeron en los extremos 5' y 3' de los bloques génicos de fusión para la clonación en el vector LV-416-IRES-puro (Clontech).

La clonación se realizó utilizando Gateway® (ThermoFisher) y todos los pasos se llevaron a cabo siguiendo el

protocolo del fabricante. Brevemente:

- 5 • Las primeras reacciones de recombinación de BP se realizaron entre fragmentos de ADN flanqueados por attB (EXD2_K193A, SEQ ID NO: 47 y EXD2_WT, SEQ ID NO: 48) y un vector pDONR-107 que contenía attP para generar un clon de entrada. Las reacciones de recombinación de BP se utilizaron para transformar células E.cloni@10G químicamente competentes (Lucigen®) según el protocolo del fabricante;
 - Las células transformadas se sembraron en placas de agar LB que contenían 50 µg/ml de kanamicina (Sigma) y se incubaron a 37 °C durante la noche;
 - Se seleccionaron dos clones de cada placa para preparar mini cultivos (2 ml) en caldo LB con kanamicina (SIGMA) (50 ug/ml). Seguido de incubación a 37 °C durante la noche con agitación.
 - 10 • El ADN plasmídico se extrajo al día siguiente de los mini cultivos utilizando el kit de minipreparación QIAGEN QuickLyse;
 - Se realizaron digestiones diagnósticas con *Bam* H1-HF (NEB) y *Pme*I (NEB) para identificar clones recombinantes. Se confirmó que tanto los clones EXD2_K193A como EXD2_WT se digirieron correctamente mediante digestión con *Bam* H1 y *Bam* H1/*Pme*I seguida de electroforesis en gel (Figura 18).
 - 15 Se eligió un clon de cada construcción (EXD2_K193A y EXD2_WT) para la reacción de recombinación LR (como se establece a continuación) para insertar las construcciones EXD2_K193A y EXD2_WT en un vector de destino pLV-416.
- Después de la selección de los clones, se realizaron reacciones de recombinación LR para transferir cada inserto EXD2 desde el clon de entrada pDONR-107 al vector de destino pLV-416 para crear un vector de expresión. La reacción de recombinación LR final se utilizó para transformar células E.cloni@10G químicamente competentes (Lucigen®) según el protocolo del fabricante. Brevemente:
- 20 • Las células transformadas se sembraron en placas de agar LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina (SIGMA) y se incubaron a 37 °C durante la noche;
 - Se recogieron seis clones de cada placa para preparar mini cultivos (2 mL) en caldo LB con Ampicilina (50 ug/ml), que se incubaron a 37 °C durante la noche con agitación;
 - 25 • Al día siguiente, se aisló el ADN plasmídico y se realizó la digestión con *Bam* H1 para identificar clones recombinantes. Los clones recombinantes se identificaron por la presencia de tres bandas del tamaño apropiado (3431, 1056 y 5844 pb - ver Figura 19). Como puede verse en la Figura 19, los seis clones seleccionados de cada placa proporcionaron los fragmentos de restricción de tamaño apropiado;
 - Se secuenciaron dos clones transducidos con las construcciones pLV-416 que contenían EXD2_K193A o EXD2_WT con los cebadores indicados en la Tabla 7 para confirmar que las construcciones eran correctas.
 - 30

Tabla 7

Cebadores utilizados para la confirmación de construcciones EXD2_K193A y EXD2_WT correctas en colonias seleccionadas

Nombre del cebador	Secuencia	SEC ID NO
Cebador EXD-F1	ACAAGCTGTACCAGCGGAAA	SEC ID NO: 49
Cebador EXD2-R1	CACCACCACCTTAAAGGGCA	SEC ID NO: 50
Cebador EXD2-F1	ACAAGCTGTACCAGCGGAAA	SEC ID NO: 51

- 35 Producir partículas virales para la transducción de células HEK293 y la generación de una línea celular HEK293 estable, con expresión de un receptor P2X₇ funcional o disfuncional, se utilizó el siguiente protocolo:
 - Se sembraron en placas células HEK293 (7x10⁶ células por matraz) un día antes de la transfección.
 - Se transfectaron células HEK293T con vectores de empaquetamiento lentivíricos y pLV-416-EXD2 y pLV-416-EXD2_WT. Para controlar la eficacia de la transfección, también se incluyó un plásmido de expresión de GFP (1 ug).
- 40 • Después de la incubación durante la noche, el medio que contenía los reactivos de transfección se retiró y se reemplazó con 10 ml de medio fresco (DMEM con FCS al 10 %). Se recogieron 10 ml de medios 24 horas después y se almacenaron en alícuotas de 2 ml a -80 °C hasta que se requirieron. Se añadieron otros 10 ml de medio nuevo (DMEM con FCS al 10 %) a los matraces que se recogieron 24 horas más tarde.

- Las partículas virales se aislaron del medio recolectado al centrifugar el medio a 1200 rpm seguido de filtración a través de un filtro de 0,45 µm. Los medios filtrados, con partículas de virus, se utilizaron para la transfección de células HEK293.

5 Para evaluar la eficacia de la transfección, se recogieron las células tras la eliminación de los segundos 10 ml de medio y se determinó el porcentaje de células positivas para GFP mediante citometría de flujo. La Figura 20 ilustra que las células HEK293 se transfectaron con pLV-416-EXD2_K193A y pLV-416-EXD2_WT con una eficacia del 97 % y el 85 %.

Para generar células HEK293 estables que sobreexpresan el dominio extracelular de P2X₇ funcional y disfuncional en su superficie celular. Se utilizó el siguiente protocolo:

- 10
- Se sembraron en placas células HEK293 (7x10⁵ por matraz) en matraces T25 un día antes de la transducción.
 - Al día siguiente, se retiró el medio de cada matraz y se añadieron medios nuevos que contenían partículas de virus producidas según el protocolo anterior según las relaciones establecidas en la Tabla 8;
 - Se añadió polibreno a cada matraz hasta una concentración final de 8 ug/ml.

Tabla 8

15 **Protocolo de transducción**

Partícula de virus	Medios	Medios con virus	Medios	Medios con virus	Medios	Medios con virus
pLV-416-EXD2	2,5 mL	2,5 mL	4 mL	1 mL	4,5 mL	0,5 mL
pLV-416-EXD2_WT	2,5 mL	2,5 mL	4 mL	1 mL	4,5 mL	0,5 mL
LV-411-GFP testigo	4 mL	1 ml (0,5 MOI)				
Concentrado de polibreno 20 mg/mL	2 uL		2 uL		2 uL	
Sin transducir	5 mL					

- 24 h después de la transducción, se retiró el medio de cada matraz y se añadió medio fresco (DMEM con FCS al 10 %) suplementado con 1600 ug/ml de G418 a todos los matraces, excepto al matraz que contenía Lentivirus testigo que expresa GFP (LV-411-GFP).
- 20
- Las células HEK293T transducidas con el virus pLV-411-GFP testigo se controlaron para determinar la expresión de GFP 72 horas después de la transducción (ver Figura 21);
 - Todas las células no transducidas murieron 4 días después del cultivo con medio complementado con G418. Las líneas celulares transducidas continuaron creciendo normalmente con G418 en el medio.

25 El dominio extracelular de receptores P2X₇ transfectados contiene etiquetas de epítipo HA y MYC. Por lo tanto, estas células pueden teñirse con anticuerpos monoclonales contra HA-y MYC- para confirmar la expresión de superficie del dominio extracelular mediante citometría de flujo.

Detección de la función de linfocitos T CAR

30 Para evaluar la funcionalidad de los CAR P2X₇ nf, las células CD8 transducidas con cada una de las construcciones CAR PEP2-2-1-1 o PEP2-472-2 (como se prepararon anteriormente) se coincubaron durante 4 horas en una placa de cultivo de fondo redondo de 96 pocillos en una proporción de 1:1 con 1X10⁴ células diana que expresan un receptor P2X₇ nf (como se preparó anteriormente) y células de cáncer de mama MDA-MB-231, que expresan un receptor P2X₇ disfuncional (células 231 P2X₇).

El porcentaje de citotoxicidad se determinó mediante un ensayo de citotoxicidad no radiactiva CytoTox 96® (Promega, Madison, Wisconsin, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Brevemente:

- 35
- 45 minutos antes de 4 horas, se añadieron 10 µl de disolución de lisis (10X) a cada pocillo por cada 100 µl de células diana;
 - Después de otros 45 minutos, las placas se centrifugaron a 250 xg durante 4 minutos;
 - Se tomaron alícuotas de 50 µl de cada pocillo y se transfirieron a una placa de fondo plano de 96 pocillos;

- Se añadieron 50 µl de reactivo CytoTox 96® a cada pocillo de la placa que contenía las alícuotas transferidas y la placa se cubrió con papel de aluminio durante 30 minutos a temperatura ambiente;
- Después de 30 minutos, se añadieron 50 µl de disolución de parada a cada pocillo y se leyó la absorbancia a 490 nm de cada pocillo.

5 Los valores de absorbancia para cada pocillo se corrigieron según las instrucciones del fabricante y se calculó el porcentaje de citotoxicidad usando la siguiente fórmula, normalizada para linfocitos T transducidos con vector vacío, para dar un cambio incremental en la muerte celular.

$$\% \text{Citotoxicidad} = \frac{\text{Experimental} - \text{Efactor espontáneo} - \text{Diana espontánea}}{\text{Diana máxima} - \text{Diana espontánea}} * 100$$

10 Como se demuestra en la Figura 22A, los linfocitos T CD8 que expresan tanto el CAR PEP2-2-1-1 como PEP2-472-2 destruyeron aproximadamente 15 y 11 veces (respectivamente) más células HEK que expresan un receptor P2X₇ disfuncional que las células CD8 transducidas con un vector vacío. Además, como se muestra en la Figura 22B, los linfocitos T CD8 que expresan los CAR PEP2-2-1-1 y PEP2-472-2 destruyeron aproximadamente 2,5 y 2,25 veces (respectivamente) más células 231 P2X₇ que las células CD8 transducidas con un vector vacío.

15 Todos los métodos descritos en la presente memoria pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en la presente memoria, está destinado simplemente a iluminar mejor las realizaciones de ejemplo y no supone una limitación en el alcance de la invención reivindicada a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica que cualquier elemento no reivindicado es esencial.

20 La descripción proporcionada en la presente memoria está relacionada con varias realizaciones que pueden compartir rasgos y características comunes. Debe entenderse que una o más características de una realización pueden combinarse con una o más características de las otras realizaciones. Además, una única característica o combinación de características de las realizaciones puede constituir realizaciones adicionales.

25 Los encabezados de materia utilizados en la presente memoria se incluyen solo para facilitar la referencia del lector y no deben usarse para limitar el tema que se encuentra a lo largo de la divulgación o las reivindicaciones. Los títulos temáticos no deben utilizarse para interpretar el alcance de las reivindicaciones o las limitaciones de estas.

30 Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita aquí es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Debe entenderse que la invención incluye todas estas variaciones y modificaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos a los que se hace referencia, o indicados en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y todas y cada una de las combinaciones de dos o más de las etapas o características.

Además, debe observarse que, como se usa en la presente memoria, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen aspectos plurales a menos que el contexto ya indique lo contrario.

35 Las solicitudes de patente futuras pueden presentarse sobre la base de la presente solicitud, por ejemplo, reivindicando la prioridad de la presente solicitud, reivindicando un estado divisional y/o reivindicando un estado de continuación. Debe entenderse que las siguientes reivindicaciones no pretenden limitar el alcance de lo que puede reivindicarse en cualquier aplicación futura.

Listado de secuencias

<110> CTM @ CRC Ltd.

40 <120> RECEPTOR QUIMÉRICO PARA ANTÍGENO Y USOS DE ESTE

<130> 1068243

<150> 2015903719

<151> 11-09-2015

<160> 54

45 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 3680

<212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 848 478 T3

<400> 1
gtcattggag gagcttgaag ttaaagactc ctgctaaaaa ccagtacgtt tcattttgca 60
gttactggga gggggccttc tgtggccctg tcaggaagag tagagctctg gtccagctcc 120
gcgcagggag ggaggctgtc accatgccgg cctgctgcag ctgcagtgat gttttccagt 180
atgagacgaa caaagtcact cggatccaga gcatgaatta tggcaccatt aagtggttct 240
tccacgtgat catcttttcc tacgtttgct ttgctctggt gagtgacaag ctgtaccagc 300
ggaaagacc tgtcatcagt tctgtgcaca ccaagtgaa ggggatagca gaggtgaaag 360
aggagatcgt ggagaatgga gtgaagaagt tgggtgcacag tgtctttgac accgcagact 420
acaccttccc tttgcagggg aactctttct tcgtgatgac aaactttctc aaaacagaag 480
gccaaagaca gcggttgtgt cccgagtatc ccaccgcag gacgctctgt tcctctgacc 540
gaggttgtaa aaagggatgg atggaccgcc agagcaaagg aattcagacc ggaaggtgtg 600
tagtgtatga agggaaccag aagacctgtg aagtctctgc ctggtgcccc atcgaggcag 660
tggaagaggc cccccggcct gctctcttga acagtgccga aaacttctact gtgctcatca 720
agaacaatat cgacttcccc ggccacaact acaccaagag aaacatcctg ccaggtttaa 780
acatcacttg taccttccac aagactcaga atccacagtg tcccattttc cgactaggag 840
acatcttccg agaaacaggc gataattttt cagatgtggc aattcagggc ggaataatgg 900
gcattgagat ctactgggac tgcaacctag accgttggtt ccatcactgc cgtcccaaat 960
acagtttccg tcgccttgac gacaagacca ccaacgtgtc cttgtaccct ggctacaact 1020
tcagatacgc caagtactac aaggaaaaca atgttgagaa acggactctg ataaaagtct 1080
tcgggatccg ttttgacatc ctggtttttg gcaccggagg aaaatttgac attatccagc 1140
tggttgtgta catcggctca accctctcct acttcggctc gcccgctgtg ttcacgact 1200
tcctcatcga cacttactcc agtaactgct gtcgctccca tatttatccc tggtgcaagt 1260

ES 2 848 478 T3

gctgtcagcc ctgtgtggtc aacgaatact actacaggaa gaagtgcgag tccattgtgg 1320
agccaaagcc gacattaaag tatgtgtcct ttgtggatga atcccacatt aggatggtga 1380
accagcagct actagggaga agtctgcaag atgtcaaggg ccaagaagtc ccaagacctg 1440
cgatggactt cacagatttg tccaggtgc ccctggccct ccatgacaca cccccgattc 1500
ctggacaacc agaggagata cagctgctta gaaaggaggc gactcctaga tccagggata 1560
gccccgtctg gtgccagtgt ggaagctgcc tcccactca actccctgag agccacaggt 1620
gcctggagga gctgtgctgc cggaaaaagc cgggggacctg catcaccacc tcagagctgt 1680
tcaggaagct ggtcctgtcc agacacgtcc tgcagttcct cctgctctac caggagccct 1740
tgctggcgt ggatgtggat tccaccaaca gccggctgcg gcaactgtgcc tacaggtgct 1800
acgccacctg gcgcttcggc tcccaggaca tggctgactt tgccatcctg cccagctgct 1860
gccgctggag gatccggaaa gagtttccga agagtgaagg gcagtacagt ggcttcaaga 1920
gtccttactg aagccaggca ccgtggtcca cgtctgtaat cccagcgctt tgggaggccg 1980
aggcaggcag atcacctgag gtcgggagtt ggagaccgc ctggctaaca aggcgaaatc 2040
ctgtctgtac taaaaataca aaaatcagcc agacatggtg gcatgcacct gcaatcccag 2100
ctactcggga ggctgaggca caagaatcac ttgaaccggg gaggcagagg ttgtagtgag 2160
cccagattgt gccactgctc tccagcctgg gaggcacagc aaactgtccc ccaaaaaaaaa 2220
aaaagagtcc ttaccaatag caggggctgc agtagccatg ttaacatgac atttaccagc 2280
aacttgaact tcacctgcaa agctctgtgg ccacattttc agccaaaggg aaatatgctt 2340
tcactttctg ttgctctctg tgtctgagag caaagtgacc tggttaaaca aaccagaatc 2400
cctctacatg gactcagaga aaagagattg agatgtaagt ctcaactctg tcccagggaa 2460
gttgtgtgac cctaggcctc tcacctctgt gcctctgtct ccttggtgcc caactactat 2520
ctcagagata ttgtgaggac aaattgagac agtgcacatg aactgtcttt taatgtgtaa 2580
agatctacat gaatcaaaa catttcatta tgaggtcaga ctaggataat gtccaactaa 2640
aaacaaacc ttttcatcct ggctggagaa tgtggagAAC taaaggtggc cacaaattct 2700
ttgacactca agtcccccaa gacctagggt ttttatctcc tccccttgaa tatgggtggc 2760
tctgattgct ttatccaaaa gtggaagtga cattgtgtca gtttcagatc ctgatcttaa 2820
gaggctgaca gcttctactt gctgtccctt ggaactcttg ctatcgggga agccagacgc 2880
catttaaaag tctgcctatc ctggccaggt gtggtggctc acacctgtaa tcccagcact 2940
ttgggagacc aaggcgggcg gatcacttaa agtcaggagt ccaagaccag actcgccaac 3000
atggtgaaac cgtatctcta ataaaaatac aaaaattagc tgggcatggt gcgggcacct 3060
gtagtcttag ctatcaagag gctgagacag gagaaacact tgaacctggg aggtggaggt 3120
tgcattgagc tgagatcgtg ccaactgcact ccaggctggg tgacagagcg agaactccatc 3180

ES 2 848 478 T3

tcaaaaaaaaa aaaaaagaaa aaaaaaatgt ctgcctatcc tgagactgcc ctgctgtgag 3240
 gaagcccaag cagtcacgtg gacagtgcct gaccagcccc agctttcaag ccatccaagc 3300
 ccagtcacca aacatgagag agaagaagcc ttcaggtgat tctggactcc actaacatat 3360
 gactgatacc gcatgataca tccaagtga gaactgcccc ataaatccag aaaaccacat 3420
 tgctatctta agtccctaag tttggggctt atttgttcca cagcaacagg taactggaac 3480
 agagggcaag cctgatgaat gggcacacag actcagocca taccttcctt ggttctaag 3540
 ttctcagga gcccggacca accctgggag cctcaggaac ttaggtttcc actggacagt 3600
 tctagaagg ctatagacca aatcaggtaa ctcaccagac cagccttga atctatcaaa 3660
 tctaactgct gagctacca 3680

<210> 2
 <211> 1788
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2
 atgccggcct gctgcagctg cagtgatgtt ttccagtatg agacgaacaa agtcactcgg 60
 atccagagca tgaattatgg caccattaag tggttcttcc acgtgatcat cttttcctac 120
 gtttgctttg ctctggtag tgacaagctg taccagcggga aagagcctgt catcagttct 180
 gtgcacacca agtggaagg gatagcagag gtgaaagg agatcgtgga gaatggagt 240
 aagaagtgg tgacacagtgt ctttgacacc gcagactaca ccttccttt gcaggggaa 300
 tctttcttgg tgatgacaaa ctttctcaa acagaaggcc aagagcagcg gttgtgtccc 360
 gagtatccca cccgcaggac gctctgttcc tctgaccgag gttgtaaaaa gggatggatg 420
 gaccgcaga gcaaaggaat tcagaccgga aggtgtgtag tgtatgaagg gaaccagaag 480
 acctgtgaag tctctgcctg gtgccccatc gaggcagtgg aagaggcccc cggcctgct 540
 ctcttgaaca gtgccgaaaa cttcactgtg ctcatcaaga acaatatcga cttccccggc 600
 cacaactaca ccacgagaaa catcctgcca ggtttaaaca tcacttgtag cttccacaag 660
 actcagaatc cacagtgtcc cttttccga ctaggagaca tcttccgaga aacaggcgat 720
 aatttttcag atgtggcaat tcagggcgga ataatgggca ttgagatcta ctgggactgc 780
 aacctagacc gttggttcca tcaactgccg cccaaataca gtttccgtcg ccttgacgac 840
 aagaccacca acgtgtcctt gtaccctggc tacaacttca gatacgcaa gtactacaag 900
 gaaaacaatg ttgagaaag gactctgata aaagtcttcg ggatccgttt tgacatcctg 960
 gtttttgga cccggaggaaa atttgacatt atccagctgg ttgtgtacat cggctcaacc 1020
 ctctcctact tcggtctggc cgctgtgttc atcgaactcc tcatcgacac ttactccagt 1080
 aactgctgtc gctcccatat ttatccctgg tgcaagtgct gtcagccctg tgtggtcaac 1140

ES 2 848 478 T3

gaatactact acaggaagaa gtgcgagtcc attgtggagc caaagccgac attaaagtat 1200
 gtgtcctttg tggatgaatc ccacattagg atggtgaacc agcagctact agggagaagt 1260
 ctgcaagatg tcaagggcca agaagtccca agacctgcca tggacttcac agatttgtcc 1320
 aggctgcccc tggccctcca tgacacaccc ccgattcctg gacaaccaga ggagatacag 1380
 ctgcttagaa aggaggcgac tcctagatcc agggatagcc ccgtctggtg ccagtgtgga 1440
 agctgcctcc catctcaact cctgagagc cacaggtgcc tggaggagct gtgctgccgg 1500
 aaaaagccgg gggcctgcat caccacctca gagctgttca ggaagctggt cctgtccaga 1560
 cacgtcctgc agttcctcct gctctaccag gagcccttgc tggcgctgga tgtggattcc 1620
 accaacagcc ggctgcgcca ctgtgcctac aggtgctacg ccacctggcg cttcggctcc 1680
 caggacatgg ctgactttgc catcctgccc agctgctgcc gctggaggat ccgaaagag 1740
 tttccgaaga gtgaaggcca gtacagtggc ttcaagagtc cttactga 1788

<210> 3

<211> 595

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 3

Met Pro Ala Cys Cys Ser Cys Ser Asp Val Phe Gln Tyr Glu Thr Asn
 1 5 10 15

Lys Val Thr Arg Ile Gln Ser Met Asn Tyr Gly Thr Ile Lys Trp Phe
 20 25 30

Phe His Val Ile Ile Phe Ser Tyr Val Cys Phe Ala Leu Val Ser Asp
 35 40 45

Lys Leu Tyr Gln Arg Lys Glu Pro Val Ile Ser Ser Val His Thr Lys
 50 55 60

Val Lys Gly Ile Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile Val Glu Asn Gly Val
 65 70 75 80

Lys Lys Leu Val His Ser Val Phe Asp Thr Ala Asp Tyr Thr Phe Pro
 85 90 95

Leu Gln Gly Asn Ser Phe Phe Val Met Thr Asn Phe Leu Lys Thr Glu
 100 105 110

Gly Gln Glu Gln Arg Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Thr Arg Arg Thr Leu
 115 120 125

ES 2 848 478 T3

Cys Ser Ser Asp Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp Met Asp Pro Gln Ser
 130 135 140

Lys Gly Ile Gln Thr Gly Arg Cys Val Val Tyr Glu Gly Asn Gln Lys
 145 150 155 160

Thr Cys Glu Val Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val Glu Glu Ala
 165 170 175

Pro Arg Pro Ala Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr Val Leu Ile
 180 185 190

Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile
 195 200 205

Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr Gln Asn Pro
 210 215 220

Gln Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu Thr Gly Asp
 225 230 235 240

Asn Phe Ser Asp Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly Ile Glu Ile
 245 250 255

Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys Arg Pro Lys
 260 265 270

Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr
 275 280 285

Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val
 290 295 300

Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu
 305 310 315 320

Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe Asp Ile Ile Gln Leu Val Val Tyr
 325 330 335

Ile Gly Ser Thr Leu Ser Tyr Phe Gly Leu Ala Ala Val Phe Ile Asp
 340 345 350

Phe Leu Ile Asp Thr Tyr Ser Ser Asn Cys Cys Arg Ser His Ile Tyr
 355 360 365

Pro Trp Cys Lys Cys Cys Gln Pro Cys Val Val Asn Glu Tyr Tyr Tyr
 370 375 380

ES 2 848 478 T3

Arg Lys Lys Cys Glu Ser Ile Val Glu Pro Lys Pro Thr Leu Lys Tyr
385 390 395 400

Val Ser Phe Val Asp Glu Ser His Ile Arg Met Val Asn Gln Gln Leu
405 410 415

Leu Gly Arg Ser Leu Gln Asp Val Lys Gly Gln Glu Val Pro Arg Pro
420 425 430

Ala Met Asp Phe Thr Asp Leu Ser Arg Leu Pro Leu Ala Leu His Asp
435 440 445

Thr Pro Pro Ile Pro Gly Gln Pro Glu Glu Ile Gln Leu Leu Arg Lys
450 455 460

Glu Ala Thr Pro Arg Ser Arg Asp Ser Pro Val Trp Cys Gln Cys Gly
465 470 475 480

Ser Cys Leu Pro Ser Gln Leu Pro Glu Ser His Arg Cys Leu Glu Glu
485 490 495

Leu Cys Cys Arg Lys Lys Pro Gly Ala Cys Ile Thr Thr Ser Glu Leu
500 505 510

Phe Arg Lys Leu Val Leu Ser Arg His Val Leu Gln Phe Leu Leu Leu
515 520 525

Tyr Gln Glu Pro Leu Leu Ala Leu Asp Val Asp Ser Thr Asn Ser Arg
530 535 540

Leu Arg His Cys Ala Tyr Arg Cys Tyr Ala Thr Trp Arg Phe Gly Ser
545 550 555 560

Gln Asp Met Ala Asp Phe Ala Ile Leu Pro Ser Cys Cys Arg Trp Arg
565 570 575

Ile Arg Lys Glu Phe Pro Lys Ser Glu Gly Gln Tyr Ser Gly Phe Lys
580 585 590

Ser Pro Tyr
595

<210> 4

<211> 164

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

ES 2 848 478 T3

<400> 4

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala
35 40 45

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95

Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
100 105 110

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
115 120 125

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
130 135 140

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
145 150 155 160

Leu Pro Pro Arg

<210> 5

<211> 207

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

ES 2 848 478 T3

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 6
<211> 180
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu
1 5 10 15

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

Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala
35 40 45

Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe
50 55 60

ES 2 848 478 T3

Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp
65 70 75 80

Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro
85 90 95

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala
100 105 110

Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val
115 120 125

Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln
130 135 140

Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
145 150 155 160

Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
165 170 175

Asn Gln Leu Arg
180

<210> 7

<211> 171

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
20 25 30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys
85 90 95

ES 2 848 478 T3

Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val
100 105 110

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His
115 120 125

Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg
130 135 140

Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Ala Gln Tyr
145 150 155 160

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
165 170

<210> 8

<211> 244

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 8

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

Pro Ser Ser Val Pro Ala Phe Glu Val Leu Glu Ile Ser Pro Gln Glu
20 25 30

Val Ser Ser Gly Arg Leu Leu Lys Ser Ala Ser Ser Pro Pro Leu His
35 40 45

Thr Trp Leu Thr Val Leu Lys Lys Glu Gln Glu Phe Leu Gly Val Thr
50 55 60

Gln Ile Leu Thr Ala Met Ile Cys Leu Cys Phe Gly Thr Val Val Cys
65 70 75 80

Ser Val Leu Asp Ile Ser His Ile Glu Gly Asp Ile Phe Ser Ser Phe
85 90 95

Lys Ala Gly Tyr Pro Phe Trp Gly Ala Ile Phe Phe Ser Ile Ser Gly
100 105 110

Met Leu Ser Ile Ile Ser Glu Arg Arg Asn Ala Thr Tyr Leu Val Arg
115 120 125

Gly Ser Leu Gly Ala Asn Thr Ala Ser Ser Ile Ala Gly Gly Thr Gly
130 135 140

ES 2 848 478 T3

Ile Thr Ile Leu Ile Ile Asn Leu Lys Lys Ser Leu Ala Tyr Ile His
145 150 155 160

Ile His Ser Cys Gln Lys Phe Phe Glu Thr Lys Cys Phe Met Ala Ser
165 170 175

Phe Ser Thr Glu Ile Val Val Met Met Leu Phe Leu Thr Ile Leu Gly
180 185 190

Leu Gly Ser Ala Val Ser Leu Thr Ile Cys Gly Ala Gly Glu Glu Leu
195 200 205

Lys Gly Asn Lys Val Pro Glu Asp Arg Val Tyr Glu Glu Leu Asn Ile
210 215 220

Tyr Ser Ala Thr Tyr Ser Glu Leu Glu Asp Pro Gly Glu Met Ser Pro
225 230 235 240

Pro Ile Asp Leu

<210> 9

<211> 374

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser
20 25 30

Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His Leu
35 40 45

Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr Gln
50 55 60

Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Asn Asp Ser
65 70 75 80

Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro Ile
85 90 95

Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Arg
100 105 110

ES 2 848 478 T3

Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp Lys
 115 120 125

Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Arg Asn Gly Lys Ala Phe
 130 135 140

Lys Phe Phe His Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn Ile
 145 150 155 160

Ser His Asn Gly Thr Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg Tyr
 165 170 175

Thr Ser Ala Gly Ile Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala Pro
 180 185 190

Val Leu Asn Ala Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu Val
 195 200 205

Thr Leu Ser Cys Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln
 210 215 220

Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg Asn
 225 230 235 240

Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser Gly
 245 250 255

Leu Tyr Trp Cys Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys Arg
 260 265 270

Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Leu Gln Leu Pro Thr Pro
 275 280 285

Val Trp Phe His Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu
 290 295 300

Val Asn Thr Val Leu Trp Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys
 305 310 315 320

Lys Lys Trp Asp Leu Glu Ile Ser Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys
 325 330 335

Val Ile Ser Ser Leu Gln Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 340 345 350

Cys Gln Glu Gln Lys Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys
 355 360 365

Glu Pro Gln Gly Ala Thr
 370

<210> 10
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PEP2-2-3

5

ES 2 848 478 T3

<400> 10

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Ser Pro Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11

<211> 357

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de PEP2-2-3

<400> 11

gaagttcaac tgctggagag tggagggggc ctctgtcagc cgggcggcag cttgcgcctg 60

tcatgtgcag caagcggggt cacctttagg aaccacgata tgggggtgggt gaggcaggct 120

10 cccggaaagg gtctggaatg ggtgagtgcc ataccagga gcggaggctc cacctactac 180

gcagactccg tgaagggctc gtttacgatt tccagagaca attccaagaa taccctgtac 240

ctgcagatga actccctccg cgccgaagat acagcagtct actactgtgc agaaccacaaa 300

ccaatggata cagaattcga ctattggagt cctggaactc ttgtcactgt atccagt 357

<210> 12

<211> 21

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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> 13

20 <211> 72

<212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 848 478 T3

<400> 13
gagcgcgtca tggctcttcc tgtgaccgca ttgctgctgc cgctggcctt gctgctgcat 60

gcagctcggc ca 72

<210> 14
<211> 228
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Bisagra larga

<400> 14
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Pro Val
1 5 10 15

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

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

10 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
65 70 75 80

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

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
100 105 110

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

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

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

Ser Leu Gly Lys
225

ES 2 848 478 T3

<210> 15
 <211> 684
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Bisagra larga

<400> 15
 gagagtaaat atggacctcc gtgtccgagt tgtcccgcgc ctctgtggc cggcccctct 60
 gtatttctgt ttccacctaa gccgaaagat acattgatga ttagccgaac accagaggtt 120
 acttgtgtgg ttgttgacgt gagtcaagag gaccctgagg tgcagtttaa ttggtatgtc 180
 gacggagttg aggtgcataa cgccaagacg aagccgcgag aggagcagtt taattccacc 240
 tacagggtcg tatccgttct cactgtcctt caccaggact ggctgaatgg gaaggagtac 300
 aatgcaaaag tgagcaataa aggcctgccg agctccatcg aaaaaacat ttccaaggca 360
 aaaggccaac cccgagagcc acaggtctat accctgccac caagccagga ggaaatgacc 420
 aagaatcagg tgagcctcac ctgtctggtc aagggttct acccgtccga catcgcggtg 480
 gagtgggaga gtaacggaca gcctgaaaac aattacaaga caacccgcc tgttttggac 540
 tctgacggct ccttttttct gtactctcgg cttaccgtgg ataagagtag atggcaagaa 600
 ggcaacgtct tcagctgttc cgtgatgcat gaggcgctgc ataaccatta tacacaaaaa 660

10 agtctgtcct tgagcctggg caaa 684

<210> 16
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Bisagra corta

<400> 16
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 1 5 10 15

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Asp Pro Lys
 20 25 30

20 <210> 17
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Bisagra corta

25 <400> 17
 ggcggcggcg gctctggcgg tgggggtagc ggaggcggcg gaagcgaatc caaatatggc 60
 cctccttgtc caccgtgccc cgatccaaag 90

<210> 18
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

ES 2 848 478 T3

<400> 18
 Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 1 5 10 15

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

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

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

Ala Tyr Arg Ser
 65

5 <210> 19
 <211> 204
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de codificación de CD28

<400> 19
 ttttgggtgc tgggtggtgt ggggggtgct ctcgcttgct acagtttggt ggtgacagtt 60
 gcctttatta ttttttgggt gcgcagtaag cggagtgccc tccttcattc cgactatatg 120
 aacatgacac ctcgccgccc aggcccaacg aggaaacatt atcagccata tgcaccacct 180
 agagactttg ccgcttaccg gtcc 204

15 <210> 20
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr
 20 25 30

Leu Ala Lys Ile
 35

20 <210> 21
 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de codificación de OX40

25 <400> 21
 cgagatcaaa ggcttcccc cgatgcacac aaaccacccg gcggtggctc atttcgaaca 60
 ccaattcagg aagagcaggc agacgcccac agcaccctgg ccaagatc 108

<210> 22
 <211> 112

ES 2 848 478 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

5 <210> 23
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia de codificación de CD3zeta

<400> 23
cgggtaaagt tcagccgaag tgcagatgcg ccggcatacc agcagggcca gaatcaattg 60
tacaatgagc ttaacctcgg ccgcagagag gagtatgatg tactggataa ggggcgcgga 120
cgggatcctg agatgggagg aaagcctcgg agaaaaaatc cccaggaagg actttacaat 180
gagttgcaga aggataagat ggccgaagca tattctgaaa tcgggatgaa aggtgagcgg 240
cggagaggaa aagccacga cgggctctac caggggctga gcacagctac taaagataca 300
tacgacgcac ttcatatgca agccctgcct ccccg 336

15 <210> 24
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> P2A

20 <400> 24
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> 25
<211> 66

ES 2 848 478 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de codificación de P2A

5 <400> 25
 ggaagcgggtg ccacgaactt ttctctcctc aaacaggctg gggacgtcga ggaaaatcca 60
 ggtccc 66

<210> 26
 <211> 611
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CAR-Bisagra larga

<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 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45

Thr Phe Arg Asn His Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 85 90 95

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp
 115 120 125

15

ES 2 848 478 T3

Tyr Trp Ser Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Glu
 130 135 140

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
 145 150 155 160

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 165 170 175

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 180 185 190

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 195 200 205

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 210 215 220

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 225 230 235 240

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 245 250 255

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 260 265 270

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 275 280 285

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 290 295 300

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 305 310 315 320

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
 325 330 335

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 340 345 350

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 355 360 365

Leu Gly Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys
 370 375 380

ES 2 848 478 T3

Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser
385 390 395 400

Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
405 410 415

Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
420 425 430

Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala
435 440 445

His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu
450 455 460

Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser
465 470 475 480

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
485 490 495

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
500 505 510

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
515 520 525

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
530 535 540

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
545 550 555 560

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
565 570 575

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr
580 585 590

Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
595 600 605

Pro Gly Glu
610

<210> 27

<211> 408

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CAR-Bisagra corta

ES 2 848 478 T3

<400> 27

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 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45

Thr Phe Arg Asn His Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 85 90 95

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp
 115 120 125

Tyr Trp Ser Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly
 145 150 155 160

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val
 165 170 175

Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe
 180 185 190

Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp
 195 200 205

Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr
 210 215 220

ES 2 848 478 T3

Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp
 225 230 235 240

Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe
 245 250 255

Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala
 260 265 270

Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
 275 280 285

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
 290 295 300

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
 305 310 315 320

Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
 325 330 335

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
 340 345 350

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
 355 360 365

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
 370 375 380

Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly
 385 390 395 400

Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
 405

<210> 28

<211> 1875

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Codificación de CAR-bisagra larga

<400> 28

gaccggcgcc tactctagag gagcgcgtca tggctcttcc tgtgaccgca ttgctgctgc 60

cgctggcctt gctgctgcat gcagctcggc cagaagtcca actgctggag agtggagggg 120

gcctcgtgca gccggggcggc agcttgcgcc tgtcatgtgc agcaagcggg ttcaccttta 180

5

10

ES 2 848 478 T3

ggaaccacga tatggggtgg gtgaggcagg ctccgggaaa gggctctgaa tgggtgagtg 240
ccatatcagg gagcggaggc tccacctact acgcagactc cgtgaagggt cggtttacga 300
tttccagaga caattccaag aataccctgt acctgcagat gaactccctc cgcgccgaag 360
atacagcagt ctactactgt gcagaaccaa aaccaatgga tacagaattc gactattgga 420
gtcctggaac tcttgtcact gtatccagtg gaggaggcga gagtaaataat ggacctccgt 480
gtccgagttg tcccgcgcct cctgtggccg gccctctgt atttctgttt ccacctaagc 540
cgaaagatac attgatgatt agccgaacac cagaggttac ttgtgtggtt gttgacgtga 600
gtcaagagga ccctgaggtg cagtttaatt ggtatgtcga cggagttgag gtgcataacg 660
ccaagacgaa gccgcgagag gagcagttta attccacctc cagggtcgtc tccgttctca 720
ctgtccttca ccaggactgg ctgaatggga aggagtacaa atgcaaagtg agcaataaag 780
gcctgccgag ctccatcgaa aaaaccattt ccaaggcaaa aggcccaacc cgagagccac 840
aggtctatac cctgccacca agccaggagg aatgaccaa gaatcaggtg agcctcacct 900
gtctgttcaa gggcttctac ccgtccgaca tcgcggtgga gtgggagagt aacggacagc 960
ctgaaaaaaa ttacaagaca accccgcctg ttttggactc tgacggctcc ttttttctgt 1020
actctcggct taccgtggat aagagtagat ggcaagaagg caacgtcttc agctgttccg 1080
tgatgcatga ggcgctgcat aaccattata cacaaaaaag tctgtccttg agcctgggca 1140
aatthtgggt gctggtggtg gtgggggggtg tcctcgcttg ctacagtttg ttggtgacag 1200
ttgcctttat tatttttttg gtgcgcagta agcggagtcg cctccttcat tccgactata 1260
tgaacatgac acctgcgcc caggcccaa cgaggaaaca ttatcagcca tatgcaccac 1320
ctagagactt tgccgcttac cggctccgag atcaaaggct tccccccgat gcacacaaac 1380
caccggcggg tggctcattt cgaacaccaa ttcaggaaga gcaggcagac gccacagca 1440
ccctggccaa gatccgggta aagttcagcc gaagtgcaga tgcgccggca taccagcagg 1500
gccagaatca attgtacaat gagcttaacc tcggccgcag agaggagtat gatgtactgg 1560
ataagcggcg cggacgggat cctgagatgg gaggaagcc tcggagaaaa aatcccaggg 1620
aaggacttta caatgagttg cagaaggata agatggccga agcatattct gaaatcggga 1680
tgaaaggtga gcggcggaga ggaaaaggcc acgacgggct ctaccagggg ctgagcacag 1740
ctactaaaga tacatacgac gcacttcata tgcaagcct gcctccccgc ggaagcggtg 1800
ccacgaactt ttctctcctc aaacaggctg gggacgtcga ggaaaatcca ggtcccggcg 1860
aattcgccac catgc 1875

<210> 29
<211> 1272
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Codificación CAR-bisagra corta

5

ES 2 848 478 T3

<400> 29
gaccggcgcc tactctagag gagcgcgtca tggccctgcc tgtgacagcc ctgctgctgc 60
cactcgctct tctccttcac gccgcaagac ccgaagtgca gcttctggag tctggaggtg 120
gtttggtgca gcctggcggg tctctcagat tgtcatgcgc cgcacccggt ttcacctttc 180
ggaaccatga tatgggttgg gtccgccagg ccccaggcaa gggctctgag tgggtctccg 240
ccatcagcgg cagtggcggg tccacatact acgcagactc cgtcaaaggc agatttacia 300
tttcacggga taatagtaag aacactctgt acctccagat gaatagtctc cgggcggagg 360
acacagctgt gtactattgc gcggagccaa agccaatgga tactgagttt gattattgga 420
gccccggaac cctggtgaca gtatccagcg gcggcggcgg ctctggcggg gggggtagcg 480
gaggcggcgg aagcgaatcc aaatatggcc ctcttctgct accgtgcccc gatccaaagt 540
tctgggtgct ggtggtagtg ggtggcgtcc tggcctgtta ttctctgctt gtgacagtcg 600
cgtttatcat cttttgggtc cggctctaac gctctagggt gttgactcc gattacatga 660
acatgacccc acgccggcct ggcctacgc ggaagcacta ccaaccttac gctcctccca 720
gggatttcgc cgcttacagg agccgagatc agagactgcc accogatgca cacaaccac 780
ccggtggtgg gtctttcagg accccaatcc aggaggagca agctgacgcg cattccaccc 840
ttgccaagat aagggtcaaa tttagtaggt cagctgacgc gccggcctat caacagggac 900
agaaccagtt gtataatgaa ctcaatctcg gacgacgcga ggagtacgac gtactggata 960
agaggcgcgg cagggatcct gaaatgggcg gcaagccccg gcgaaaaaac ccccaggagg 1020
gactctaaa tgagctgcag aaggacaaa tggcagaagc ttactccgaa attggaatga 1080
agggcgaaag aaggagaggg aaagggcacg atggcctgta tcagggcctg agtaccgcca 1140
ccaaggacac gtatgatgcc ctgcatatgc aggcactgcc ccctagagga agcgggggcta 1200
cgaatttcag cctcctgaaa caggctggcg acgtggagga aaatccgggg ccaggcgaat 1260
tcgccaccat gc 1272

<210> 30
<211> 21
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
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

10

<210> 31
<211> 63
<212> ADN
<213> Homo sapiens

15

<400> 31
atggtctctc ctgtgaccgc attgctgctg ccgctggcct tgctgctgca tgcagctcgg 60
cca 63

ES 2 848 478 T3

<210> 32
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido de unión PEP2-2-1-1

<400> 32
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Arg Ser Pro Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 33
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de unión PEP2-472-2

ES 2 848 478 T3

<400> 33

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Pro Met Lys
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Arg Ser Pro Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Leu Glu
115

<210> 34

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de unión PEP2-2-12

<400> 34

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
50 55 60

10 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Pro Ser Pro Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

ES 2 848 478 T3

<210> 35
 <211> 1864
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Receptor quimérico para antígeno PEP2-2-1-1

<400> 35
 cctccataga agattctaga gctagcgaat tctgcagtcg acggtaccgc gggcccggga 60
 tccaccgggtg ccgccgccat ggctcttcct gtgaccgcat tgctgctgcc gctggccttg 120
 ctgctgcatg cagctcggcc agaagttcaa ctgctggaga gtggaggggg cctcgtgcag 180
 ccgggcgcca gcttgccct gtcattgtca gcaagcgggt tcaccttag gaaccacgat 240
 atggggtggg tgaggcaggc tccgggaaag ggtctggaat gggtgagtgc catatcaggg 300
 agcggaggct ccacctacta cgcagactcc gtgaagggtc ggtttacgat ttccagagac 360
 aattccaaga ataccctgta cctgcagatg aactccctcc gcgccgaaga tacagcagtc 420
 tactactgtg cagaaccaa accaatggat acagaattcg actataggag tcctggaact 480
 cttgtcactg tatccagtgg aggaggcgag agtaaatatg gacctccgtg tccgagttgt 540
 cccgcgcctc ctgtggccgg cccctctgta tttctgtttc cacctaagcc gaaagataca 600
 ttgatgatta gccgaacacc agaggttact tgtgtggttg ttgacgtgag tcaagaggac 660
 cctgaggtgc agtttaattg gtatgtcgac ggagttgagg tgcataacgc caagacgaag 720
 ccgcgagagg agcagtttaa ttccacctac agggtcgtat ccgttctcac tgccttcac 780
 caggactggc tgaatgggaa ggagtacaaa tgcaaagtga gcaataaagg cctgccgagc 840
 tccatcgaaa aaaccatttc caaggcaaaa ggccaacccc gagagccaca ggtctatacc 900
 ctgccaccaa gccaggagga aatgaccaag aatcagggtg gcctcacctg tctggtcaag 960
 ggcttctacc cgtccgacat cgcgggtggag tgggagagta acggacagcc tgaaaacaat 1020
 tacaagacaa ccccgcctgt ttggactct gacggctcct tttttctgta ctctcgctt 1080
 accgtggata agagtagatg gcaagaaggc aacgtcttca gctgttccgt gatgcatgag 1140
 gcgctgcata accattatac acaaaaaagt ctgtccttga gcctgggcaa acctttttgg 1200

ES 2 848 478 T3

gtgctggtgg tgggtggggg tgtcctcgct tgctacagtt tgttggtgac agttgccttt 1260
 attatTTTTT ggggtgcgcag taagcggagt cgcctccttc attccgacta tatgaacatg 1320
 acacctcgcc gccaggccc aacgaggaaa cattatcagc catatgcacc acctagagac 1380
 tttgccgctt accggtcccc agatcaaaagg cttccccccg atgcacacaa accacccggc 1440
 ggtggctcat ttcgaacacc aattcaggaa gagcaggcag acgccacag caccctggcc 1500
 aagatccggg taaagttagc ccgaagtga gatgcgcccg cataccagca gggccagaat 1560
 caattgtaca atgagcttaa cctcggccgc agagaggagt atgatgtact ggataagcgg 1620
 cgcggacggg atcctgagat gggaggaaa cctcggagaa aaaatcccc ggaaggactt 1680
 tacaatgagt tgcagaagga taagatggcc gaagcatatt ctgaaatcgg gatgaaagg 1740
 gagcgcggga gagaaaagg ccacgacggg ctctaccagg ggctgagcac agctactaaa 1800
 gatacatagc acgcacttca tatgcaagcc ctgcctcccc gcgcccggc agcatcgata 1860
 agta 1864

<210> 36
 <211> 1863
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Receptor quimérico para antígeno PEP2-472-2

<400> 36
 cctccataga agattctaga gctagcgaat tctgcagtcg acggtaccgc gggcccggga 60
 tccaccggtc cgccgccatg gcattgccag ttacggcgct cctcctgcc a ctgcactcc 120
 tcttgcacgc agctcgacct gaggtccagc ttctcgagtc cggtggtgga cttgtgcaac 180
 cgggcggctc cttgcgactt tctgtgccc cctccggtta cactttcccc atgaaagaca 240
 tgggatgggt gcgccaggcg ccagggaaagg gtcttgagtg ggtcagcgcct ataagtggga 300
 gtggtggggg aacatattat gcagattcag taaaaggccg cttcactatc agtcgcgata 360
 acagcaaaa cacactgtat cttcagatga atagcttgag agctgaagat acggcgggtg 420
 attactgtgc ggagccgaaa ccaatggata ccgagttcga ctaccgctcc cctggcacct 480
 tggttactgt cctgaaggc ggcggagaga gcaagtacgg gccgccgtgc ccaagttgcc 540
 ctgccccgcc tgtggctggt ccttcagttt tctgtttcc gcctaaacca aaagacactc 600
 ttatgatctc tcgacgcct gaagtcaact gtgtgtcgt agatgtcagt caggaggacc 660
 cggaagtcca atttaattgg tacgtgatg gagttgaggt gcataacgcc aagacgaagc 720
 cgcgagagga gcagtttaat tccacctaca gggcgtatc cgttctcact gtccttcacc 780
 aggactggct gaatgggaag gagtacaaat gcaaagtga caataaaggc ctgccgagct 840
 ccatcgaaaa aaccatttcc aaggcaaaag gccaaccccc agagccacag gtctataccc 900

5

10

ES 2 848 478 T3

tgccaccaag ccaggaggaa atgaccaaga atcaggtgag cctcacctgt ctggtcaagg 960
 gcttctaccc gtccgacatc gcggtggagt gggagagtaa cggacagcct gaaaacaatt 1020
 acaagacaac cccgcctggt ttggactctg acggctcctt ttttctgtac tctcggctta 1080
 ccgtggataa gagtagatgg caagaaggca acgtcttcag ctggtccgtg atgcatgagg 1140
 cgctgcataa ccattataca caaaaaagtc tgccttgag cctgggcaaa cctttttggg 1200
 tgctggtggt ggtgggggggt gtcctcgctt gctacagttt gttggtgaca gttgccttta 1260
 ttatTTTTTg ggtgcgagcgt aagcggagtc gcctccttca ttccgactat atgaacatga 1320
 cacctcgccg cccaggccca acgaggaaac attatcagcc atatgcacca cctagagact 1380
 ttgccgctta ccggtcccga gatcaaaggc ttccccccga tgcacacaaa ccaccggcg 1440
 gtggctcatt tcgaacacca attcaggaag agcaggcaga cgcccacagc accctggcca 1500
 agatccgggt aaagttcagc cgaagtgcag atgcgccggc ataccagcag ggccagaatc 1560
 aattgtacaa tgagcttaac ctcggccgca gagaggagta tgatgtactg gataagcggc 1620
 ggggacggga tcctgagatg ggaggaaagc ctcgagaaa aaatccccag gaaggacttt 1680
 acaatgagtt gcagaaggat aagatggccg aagcatattc tgaaatcggg atgaaagggtg 1740
 agcggcggag aggaaaaggc cacgacgggc tctaccaggg gctgagcaca gctactaaag 1800
 atacatcga cgcacttcat atgcaagccc tgcctccccg cgcggccgca gcatcgataa 1860
 gta 1863

<210> 37
 <211> 1863
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Receptor quimérico para antígeno PEP2-2-12

<400> 37
 cctccataga agattctaga gctagcgaat tctgcagtcg acggtaccgc gggcccggga 60
 tccaccggtc cgccgccatg gctctgcccg taactgctct ctttcttcca cttgactgac 120
 ttctccacgc ggctaggccg gaagtccaac ttctggaatc tggaggtggt ctctgacagc 180
 ctggcggatc cctccggcct tcttgccgag cttcaggatt cacatttcgg aaccacgaca 240
 tgggggtgggt taggcaagcg ccgggcaagg gcctcgaatg ggtttcagcc atatctggtt 300
 ccggaggttc tacctactat gctaactcag tcaaggcgag atttacgatc tcaagagaca 360
 atagtaagaa cacgctgtac cttcagatga actctcttag agcagaagat acagctgtgt 420
 actattgtgc tgaaccgaag cctatggata ctgagtttga ctaccctagt ccggggacgc 480
 10 tggtaacctg ctccagtggt ggcggagaaa gcaaatcagg tccccctgc ccctcttgc 540

ES 2 848 478 T3

ctgccccgcc tgtggctggt ccttcagttt tcctgtttcc gcctaaacca aaagacactc 600
 ttatgatttc tcgcacgcct gaagtcactt gtgttgctgt agatgtcagt caggaggacc 660
 cggaagtcca atttaattgg tacgtggatg gagttgaggt gcataacgcc aagacgaagc 720
 cgcgagagga gcagtttaat tccacctaca gggtcgtatc cgttctcact gtccttcacc 780
 aggactggct gaatgggaag gagtacaaat gcaaagtgag caataaaggc ctgccgagct 840
 ccatcgaaaa aaccatttcc aaggcaaaag gccaaccccg agagccacag gtctataccc 900
 tgccaccaag ccaggaggaa atgaccaaga atcaggtgag cctcacctgt ctggtcaagg 960
 gcttctaccc gtcggacatc gcggtggagt gggagagtaa cggacagcct gaaaacaatt 1020
 acaagacaac cccgcctggt ttggactctg acggctcctt ttttctgtac tctcggctta 1080
 ccgtggataa gagtagatgg caagaaggca acgtcttcag ctggtccgtg atgcatgagg 1140
 cgctgcataa ccattataca caaaaaagtc tgtccttgag cctgggcaaa cctttttggg 1200
 tgctggtggt ggtggggggg gtcctcgctt gctacagttt gttggtgaca gttgccttta 1260
 ttattttttg ggtgocgagt aagcggagtc gcctccttca ttcogactat atgaacatga 1320
 cacctcgccg cccaggccca acgaggaaac attatcagcc atatgcacca cctagagact 1380
 ttgccgctta ccggtcccga gatcaaaggc ttccccccga tgcaacacaaa ccacccggcg 1440
 gtggctcatt tcgaacacca attcaggaag agcaggcaga cgcccacagc accctggcca 1500
 agatccgggt aaagttcagc cgaagtgcag atgcgccggc ataccagcag ggccagaatc 1560
 aattgtacaa tgagcttaac ctcgcccgca gagaggagta tgatgtactg gataagcggc 1620
 gcggacggga tcctgagatg ggaggaaagc ctcgagaaa aaatccccag gaaggacttt 1680
 acaatgagtt gcagaaggat aagatggccg aagcatattc tgaaatcggg atgaaagggtg 1740
 agcggcggag aggaaaaggc cacgacgggc tctaccaggg gctgagcaca gctactaaag 1800
 atacatacga cgcacttcat atgcaagccc tgctccccg cgcggccgca gcatcgataa 1860
 gta 1863

- <210> 38
- <211> 20
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador pCHD-CMV-Dir
- <400> 38
- 10 ggtgggaggt ctatataagc 20
- <210> 39
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
- <223> Cebador pCHD-coGFP-Inv
- <400> 39
- tgatcggca ctcgatctc 19
- <210> 40
- 20 <211> 19

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 2-2-1-1-Inv
 5 <400> 40
 cttcacggag tctgcgtag 19

 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 2-2-1-1-Dir

 <400> 41
 tctgtcact gtatccagt 20
 15 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Cebador 2-472-2-Inv

 <400> 42
 cgtatctca gctctcaagc 20

 <210> 43
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 2-472-2-Dir

 <400> 43
 30 tggctctca gtttctgt 20

 <210> 44
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador 2-12-2-Inv

 <400> 44
 cagctgtatc ttctgctc 18

 <210> 45
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador Com-For-1
 45 <400> 45
 agtgggagag taacggacag 20

 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

ES 2 848 478 T3

<220>
<223> Cebador Com-For-2

<400> 46
agggccagaa tcaattgtac 20

5 <210> 47
<211> 1117
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Bloque génico de fusión EXD2_K193A

<400> 47
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcta tggagacaga cacactcctg ctatgggtac 60
tgctgctctg ggttccaggt tccactgggtg actatccata tgatgttcca gattatgctg 120
gggccagtga caagctgtac cagcggaaag agcctgtcat cagttctgtg cacaccaagg 180
tgaaggggat agcagaggtg aaagaggaga tctgtggagaa tggagtgaag aagttggtgc 240
acagtgtctt tgacaccgca gactacacct tccctttgca ggggaactct ttcttctgta 300
tgacaaaactt tctcaaaaca gaaggccaag agcagcgggt gtgtcccag tatcccacc 360
gcaggacgct ctgttcctct gaccgaggtt gtaaaaagg atggatggac ccgcagagca 420
aaggaattca gaccggaagg tgtgtagtgt atgaaggaa ccagaagacc tgtgaagtct 480
ctgcctgggtg ccccatcgag gcagtggaag agggcccccg gcctgctctc ttgaacagtg 540
ccgaaaactt cactgtgctc atcgcaaca atatcgactt ccccgccac aactacacca 600
cgagaaacat cctgccaggt ttaaacatca cttgtacctt ccacaagact cagaatccac 660
agtgtcccat tttccgacta ggagacatct tccgagaaac aggcgataat ttttcagatg 720
tggcaattca gggcggaata atgggcattg agatctactg ggactgcaac ctagaccggt 780
ggttccatca ctgccgtccc aaatacagtt tccgtcgcct tgacgacaag accaccaacg 840
tgtccttgta ccctggctac aacttcagat acgccaagta ctacaaggaa aacaatggtg 900
agaaagaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgaatgc tgtgggccag gacacgcagg 960
aggatcatgt ggtgccacac tcccttgcct ttaaggtggt ggtgatctca gccatcctgg 1020
ccctggtggt gctcaccatc atctccctta tcatcctcat catgcttttg cagaagaagc 1080
cacgttagac ccagctttct tgtacaaaagt ggtcccc 1117

15 <210> 48
<211> 1117
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Bloque génico de fusión EXD2_WT

ES 2 848 478 T3

	<400> 48	
	ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcta tggagacaga cacactcctg ctatgggtac	60
	tgctgctctg ggttccaggt tccactggtg actatccata tgatgttcca gattatgctg	120
	gggccagtga caagctgtac cagcggaaag agcctgtcat cagttctgtg cacaccaag	180
	tgaaggggat agcagagggt aaagaggaga tcgtggagaa tggagtgaag aagttggtgc	240
	acagtgtctt tgacaccgca gactacacct tccctttgca ggggaactct ttcttcgtga	300
	tgacaaaactt tctcaaaaaca gaaggccaag agcagcgggt gtgtcccag tatcccacc	360
	gcaggacgct ctgttcctct gaccgaggtt gtaaaaagg atggatggac cgcagagca	420
	aaggaattca gaccggaag tgtgtagtgt atgaaggaa ccagaagacc tgtgaagtct	480
	ctgcctggtg ccccatcgag gcagtggaag aggcccccg gcctgctctc ttgaacagt	540
	ccgaaaactt cactgtgctc atcaagaaca atatcgactt ccccgccac aactacacca	600
	cgagaaacat cctgccaggt taaacatca cttgtacctt ccacaagact cagaatccac	660
	agtgtcccat tttccgacta ggagacatct tccgagaaac aggcgataat ttttcagatg	720
	tggcaattca ggcggaata atgggcattg agatctactg ggactgcaac ctagaccgtt	780
	ggttccatca ctgccgtccc aaatacagtt tccgtgcct tgacgacaag accaccaacg	840
	tgtccttgta cctggctac aacttcagat acgccaagta ctacaaggaa aacaatgtg	900
	agaaagaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgaatgc tgtgggccag gacacgcagg	960
	aggatcatgt ggtgccacac tcttgcctt ttaaggtggt ggtgatctca gccatcctgg	1020
	ccctggtggt gctcaccatc atctccctta tcatcctcat catgctttgg cagaagaagc	1080
	cacgttagac ccagctttct tgtacaaagt ggtcccc	1117
	<210> 49	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador EXD-F1	
	<400> 49	
10	acaagctgta ccagcgaaa 20	
	<210> 50	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador EXD2-R1	
	<400> 50	
	caccaccacc ttaaaggca 20	
	<210> 51	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador EXD2-F1	
25	<400> 51	
	acaagctgta ccagcgaaa 20	

ES 2 848 478 T3

<210> 52
<211> 588
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de CAR PEP2-2-1-1

<400> 52
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 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Thr Phe Arg Asn His Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

ES 2 848 478 T3

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 85 90 95
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp
 115 120 125
 Tyr Arg Ser Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Glu
 130 135 140
 Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
 145 150 155 160
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 165 170 175
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 180 185 190
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 195 200 205
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 210 215 220
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 225 230 235 240
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 245 250 255
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 260 265 270
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 275 280 285
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 290 295 300
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 305 310 315 320
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val

ES 2 848 478 T3

<400> 53

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 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr
 35 40 45

Thr Phe Pro Met Lys Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr
 65 70 75 80

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 85 90 95

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp
 115 120 125

Tyr Arg Ser Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Leu Glu Gly Gly Gly Glu
 130 135 140

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
 145 150 155 160

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 165 170 175

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 180 185 190

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

ES 2 848 478 T3

	195						200							205	
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr
	210					215					220				
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
225					230					235					240
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile
				245					250					255	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
			260					265					270		
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
		275					280					285			
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
	290					295					300				
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
305					310					315					320
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val
				325					330					335	
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
			340					345					350		
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
		355					360					365			
Leu	Gly	Lys	Pro	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala
	370					375					380				
Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg
385					390					395					400
Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro
				405					410					415	
Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro
			420					425					430		
Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Pro	Asp
		435					440					445			

ES 2 848 478 T3

Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu
450 455 460

Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe
465 470 475 480

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu
485 490 495

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
500 505 510

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
515 520 525

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
530 535 540

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
545 550 555 560

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
565 570 575

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
580 585

<210> 54

<211> 588

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de CAR PEP2-2-12

<400> 54

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 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Thr Phe Arg Asn His Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr

10

ES 2 848 478 T3

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
 325 330 335

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 340 345 350

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 355 360 365

Leu Gly Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala
 370 375 380

Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg
 385 390 395 400

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
 405 410 415

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
 420 425 430

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp
 435 440 445

Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu
 450 455 460

Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe
 465 470 475 480

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu
 485 490 495

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
 500 505 510

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
 515 520 525

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
 530 535 540

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
 545 550 555 560

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
 565 570 575

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 580 585

REIVINDICACIONES

1. Un receptor quimérico para antígeno que incluye:
 - un dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce un receptor P2X₇ disfuncional;
 - un dominio transmembrana; y
- 5 un dominio de señalización que incluye una porción de señalización intracelular de un receptor de activación y/o una porción de señalización intracelular de un receptor coestimulador.
2. El receptor quimérico para antígeno según la reivindicación 1, en el que el dominio de reconocimiento de antígeno incluye una porción que tiene identidad de secuencia con: un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo; o un sitio de unión a antígeno de un fragmento de un anticuerpo.
- 10 3. El receptor quimérico para antígeno según la reivindicación 1 o 2, en donde el dominio de reconocimiento de antígeno incluye una porción que tiene identidad de secuencia con al menos la región determinante de complementariedad 1 (CDR1), CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de un anticuerpo o la cadena ligera de un anticuerpo.
- 15 4. El receptor quimérico para antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el dominio de reconocimiento de antígeno reconoce un epítipo asociado con un sitio de unión a trifosfato de adenosina (ATP) del receptor P2X₇ disfuncional.
5. El receptor quimérico para antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el receptor P2X₇ disfuncional tiene una capacidad reducida para unirse a ATP en comparación con la capacidad de unión de ATP de un receptor P2X₇ natural (funcional).
- 20 6. El receptor quimérico para antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el receptor P2X₇ disfuncional tiene un cambio conformacional que hace que el receptor sea disfuncional.
7. El receptor quimérico para antígeno según la reivindicación 6, en donde el cambio conformacional que hace que el receptor sea disfuncional es un cambio de conformación trans a conformación cis de prolina en la posición aminoacídica 210 del receptor P2X₇ disfuncional.
- 25 8. El receptor quimérico para antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el dominio de reconocimiento de antígeno reconoce un epítipo que incluye prolina en la posición aminoacídica 210 del receptor P2X₇ disfuncional.
9. El receptor quimérico para antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el receptor de activación es un miembro del complejo correceptor de CD3 y/o un receptor Fc, y/o en donde el receptor coestimulador se selecciona del grupo que consiste en CD27, CD28, CD30, CD40, DAP10, OX40, 4-1BB (CD137) e ICOS.
- 30 10. Una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica el receptor quimérico para antígeno según las reivindicaciones 1 a 9.
11. Un vector viral que incluye un ácido nucleico según la reivindicación 10, para la transducción viral de una célula hospedante.
- 35 12. Una célula genéticamente modificada, la célula que incluye el receptor quimérico para antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 11, en donde opcionalmente la célula es un leucocito, una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), un linfocito, un linfocito T, un linfocito T CD4 +, un linfocito T CD8+, una célula citolítica natural o un linfocito T citolítico natural.
- 40 13. Una célula genéticamente modificada según la reivindicación 12, para su uso en un método para destruir una célula que expresa un Receptor P2X₇ disfuncional, el método incluye exponer la célula que expresa un receptor P2X₇ disfuncional a la célula genéticamente modificada.
- 45 14. La célula genéticamente modificada para su uso según la reivindicación 13, en donde la célula que expresa un receptor P2X₇ disfuncional es una célula cancerosa, en donde opcionalmente la célula cancerosa se selecciona de uno o más de; cáncer de cerebro, cáncer de esófago, cáncer de boca, cáncer de lengua, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cánceres de células epiteliales, cáncer de piel, leucemia, linfoma, mieloma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio y cáncer de testículo, preferiblemente en donde la célula cancerosa se selecciona entre una o más de; cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cánceres de vagina, cánceres de células epiteliales, cáncer de piel, cánceres relacionados con la sangre, cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer de útero y cáncer de testículo.
- 50

15. Una composición farmacéutica que incluye una célula genéticamente modificada según la reivindicación 12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

FIGURA 1

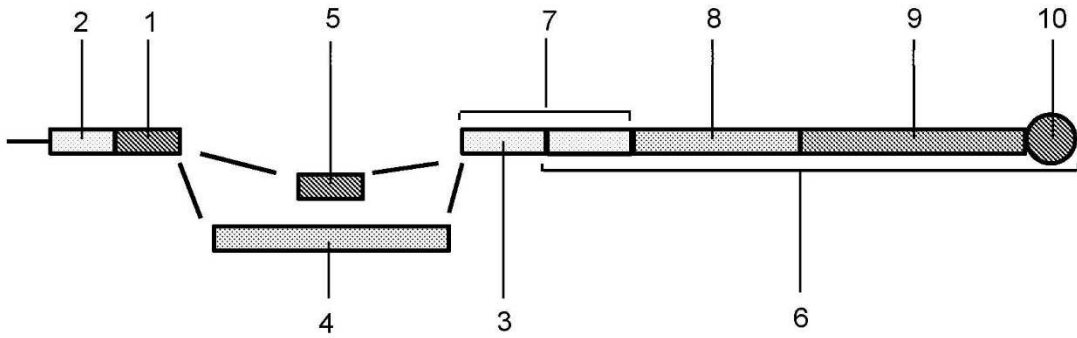


FIGURA 2

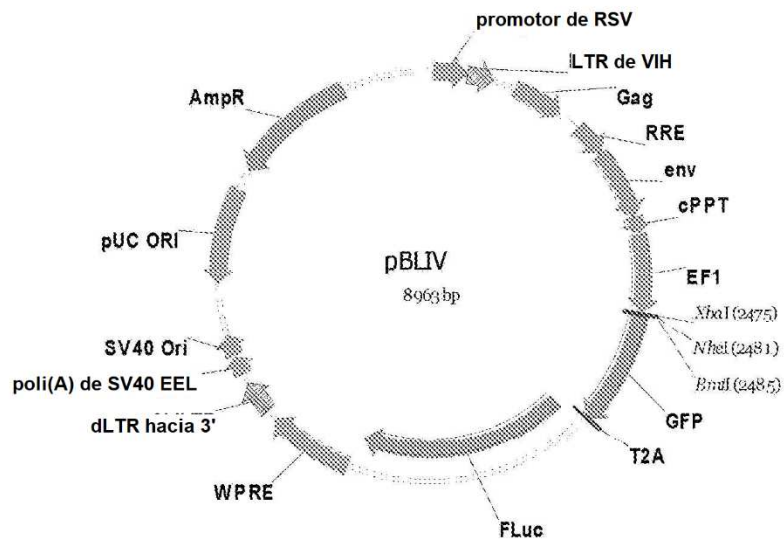


FIGURA 3

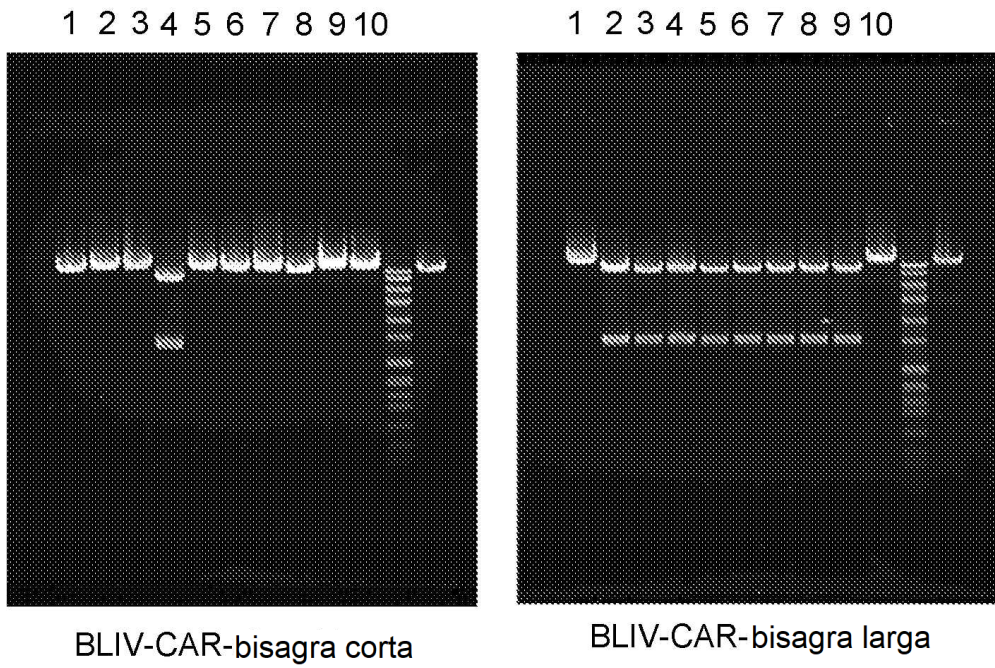


FIGURA 4

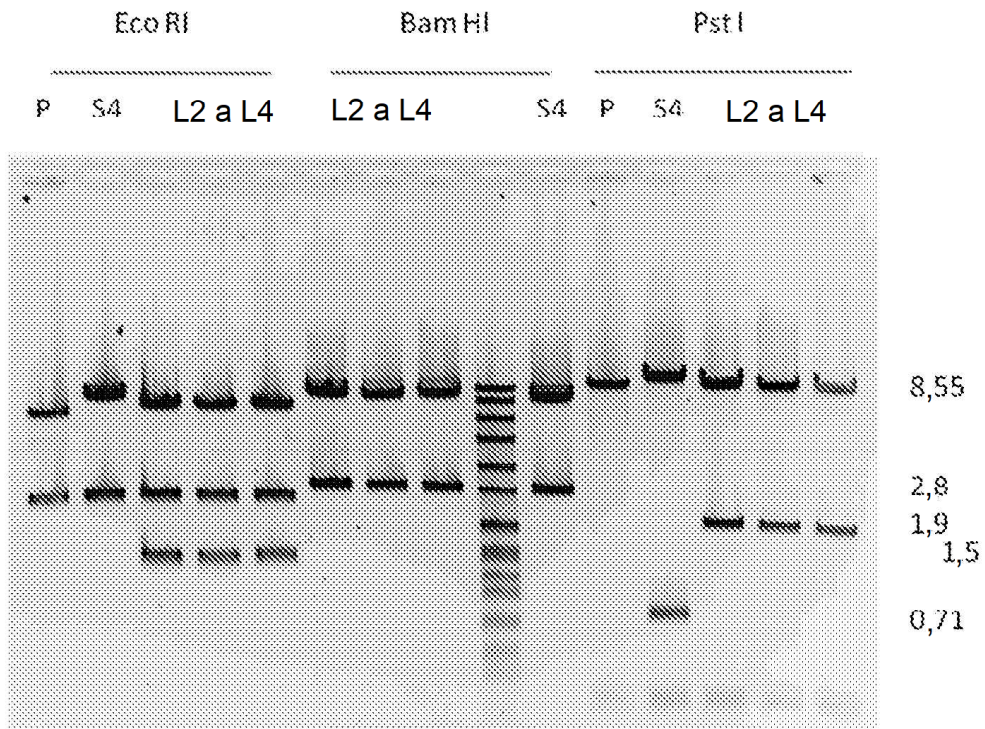


FIGURA 5

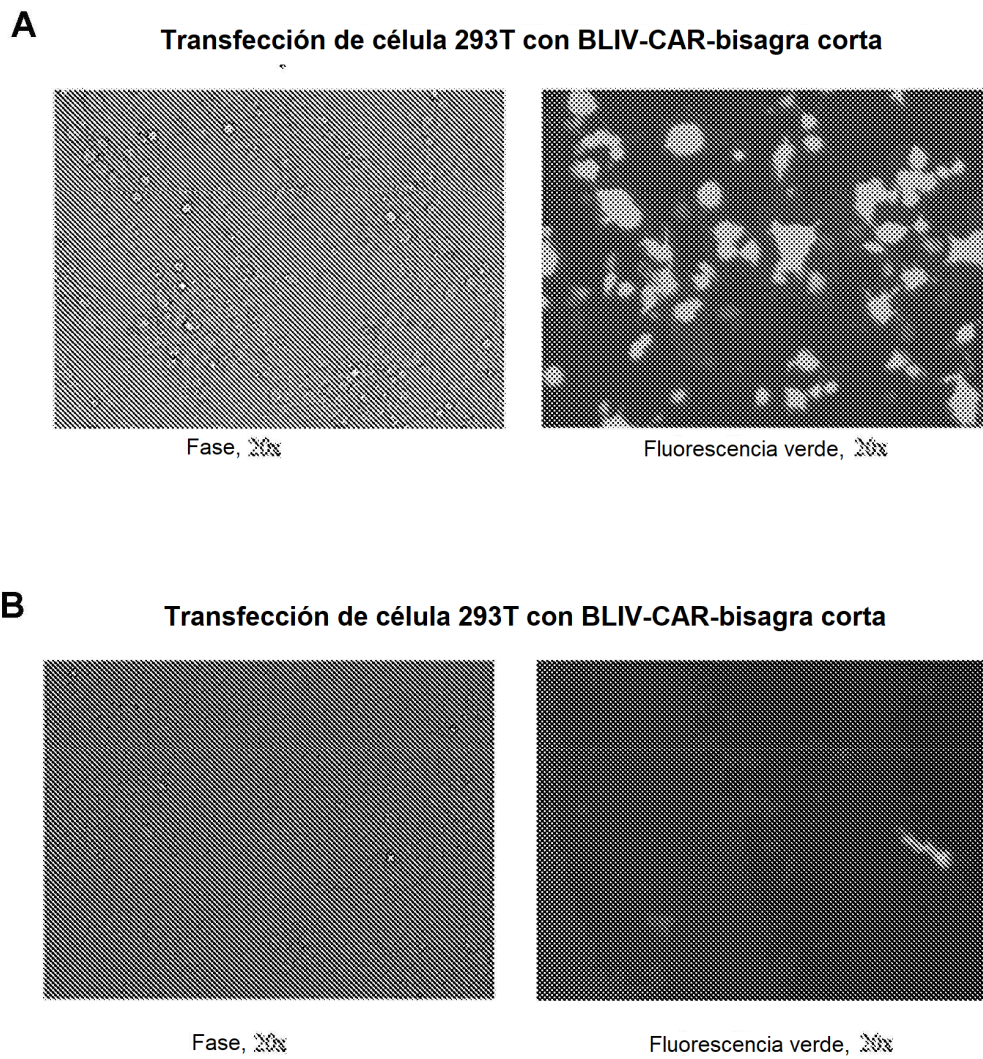


FIGURA 6

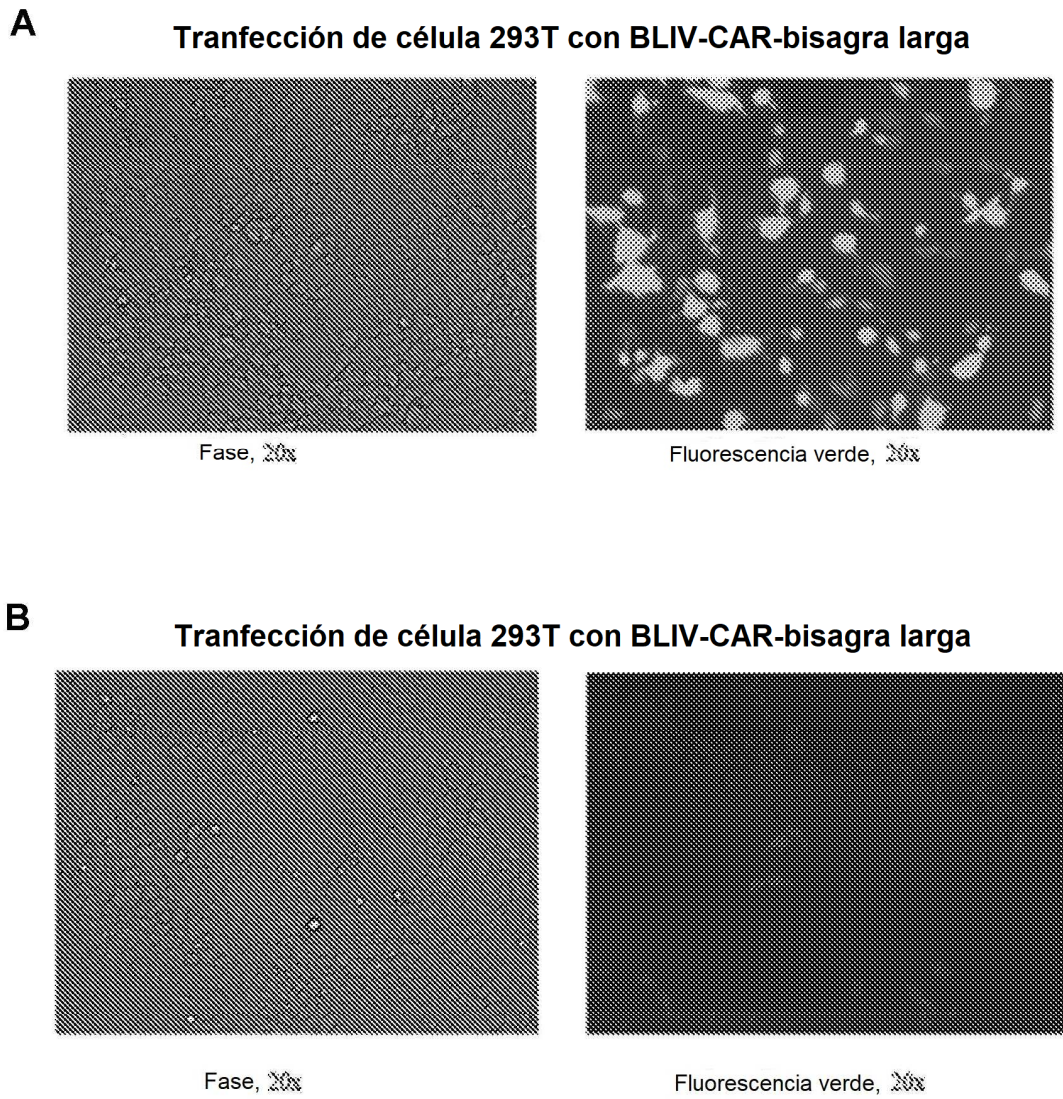


FIGURA 7

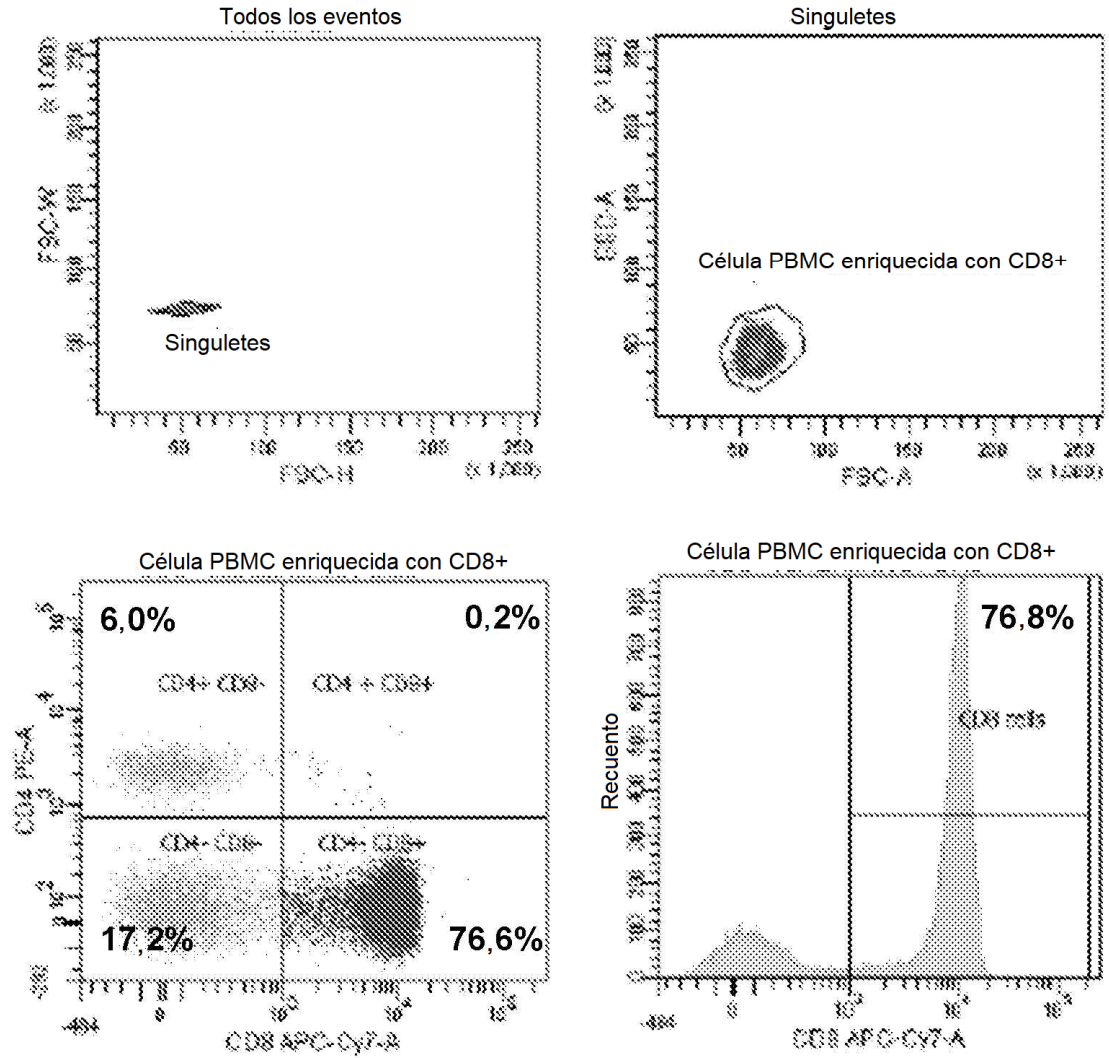


FIGURA 8

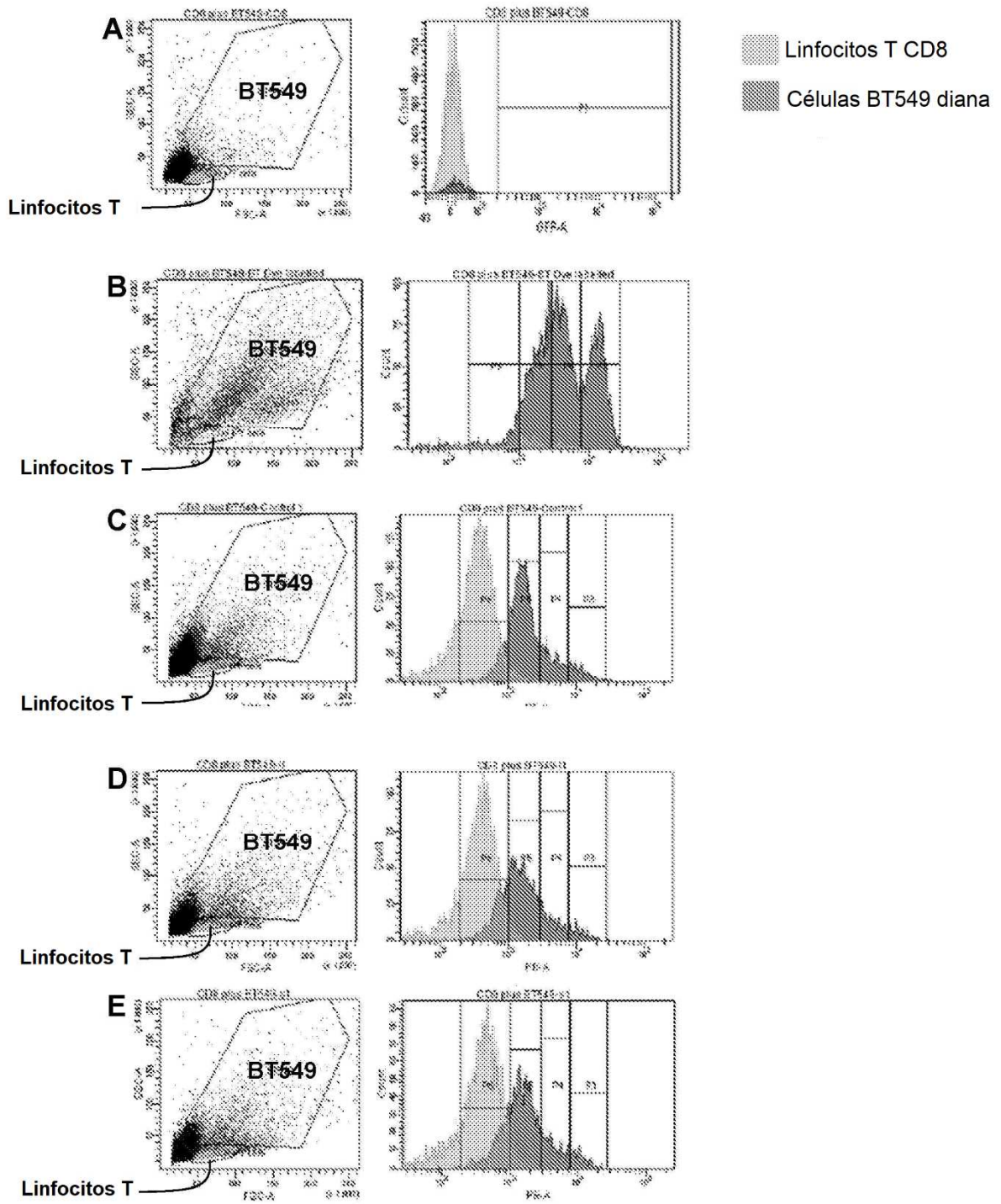


FIGURA 9

% de dianas marcadas con tinte eliminadas
1:1 diana:efector 48 h

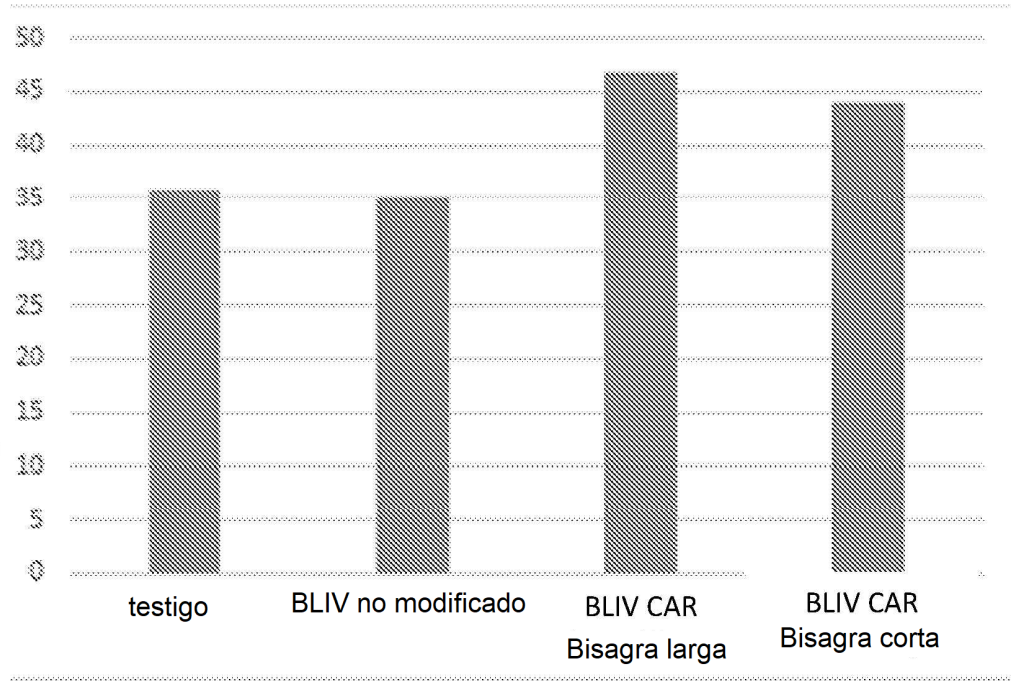


FIGURA 12

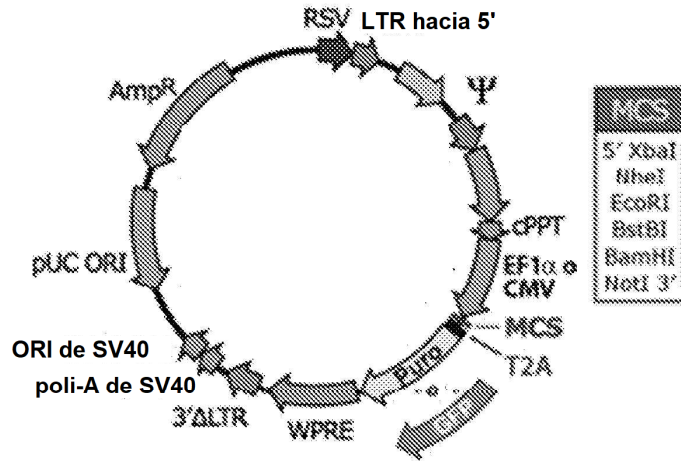


FIGURA 13

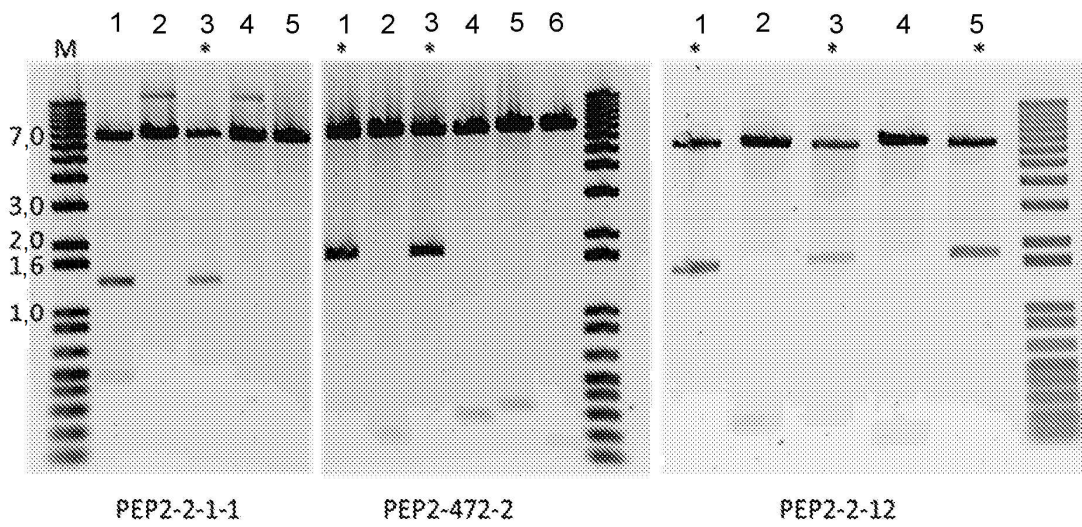


FIGURA 14

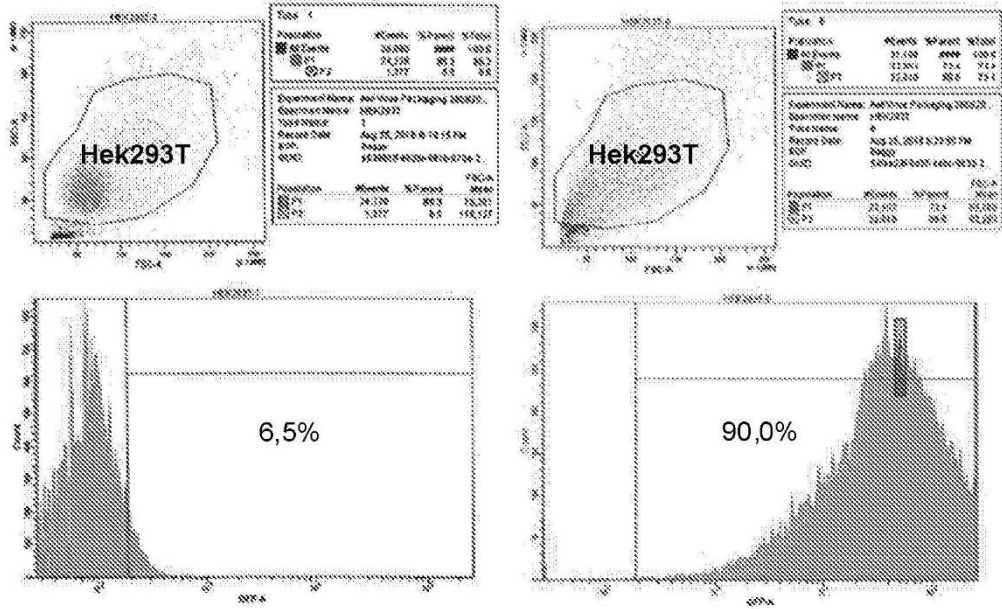


FIGURA 15

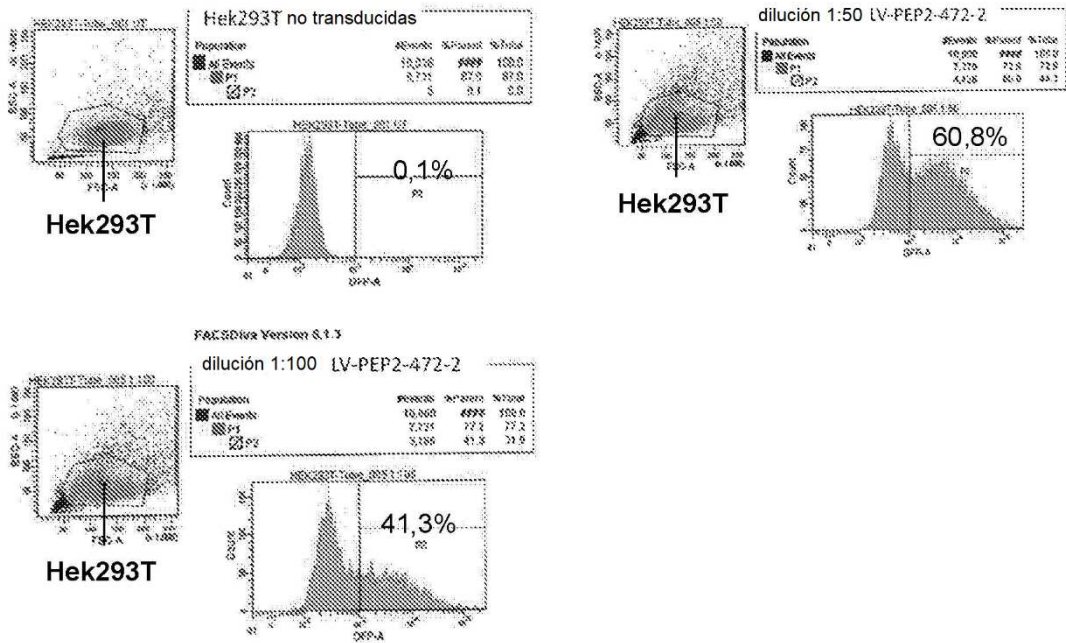


FIGURA 16

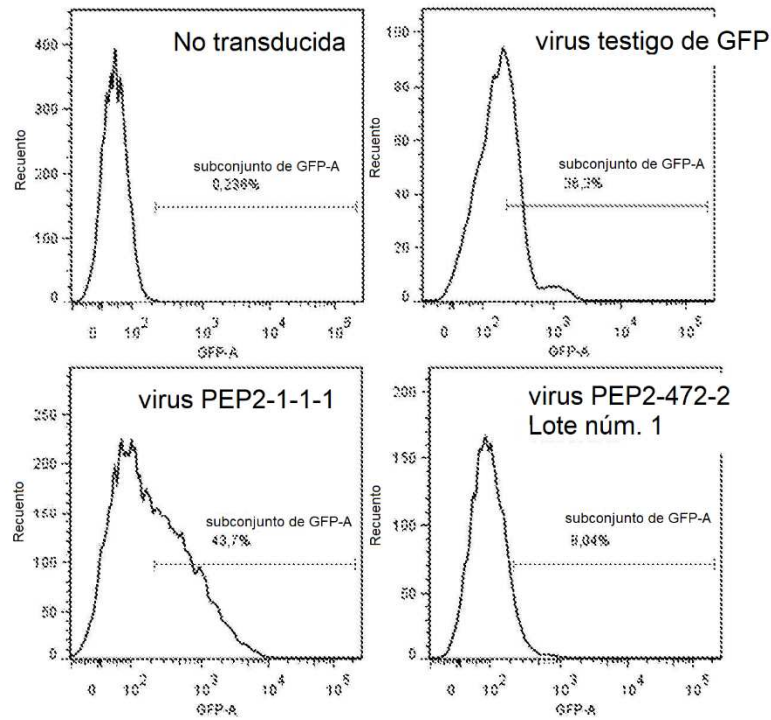


FIGURA 17

secuencia líder de cadena k de Ig

```

721  CTTGGGGATA TCCACC ATG GAG ACA GAC ACA CTC CCG CTA TCG GTA CCG CTC
      Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu
      epitopo de hemaglutinina A
743  CTC TCG GTT CCA GGT TCC ACE CGT GAC TAT CCA TAT GAT GTT CCA GAT
      Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp
      Sfi I Bgl II Xba I Sma I Sac II Pst I Acc I
821  TAT GCT GGG GCG CAGCCGGCCG GATCTCCCGG GATCCCGCG CAGCAGGTC GAC
      Tyr Ala
      epitopo de myc
874  GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTA AATGCTGTGG GCCAGGACAC
      Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Gln Asp Leu ...
      dominio transmembrana de PDGFR (extremo hacia 5')
924  GUAABAGGTC ATCGTGTGTG CACACTCCCTT GCCCTTFAAG ATGGTGGTGA TCTCAGCCAT
934  CCTGGCCCTG STGGTGGTCA GCATCATCTC CCTATCATC CECATCATGC TTTGGCAGAA
PDGFR (extremo hacia
1044  GAABCCACGT TAGGCGGCGG CTCGAGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA
    
```


FIGURA 20

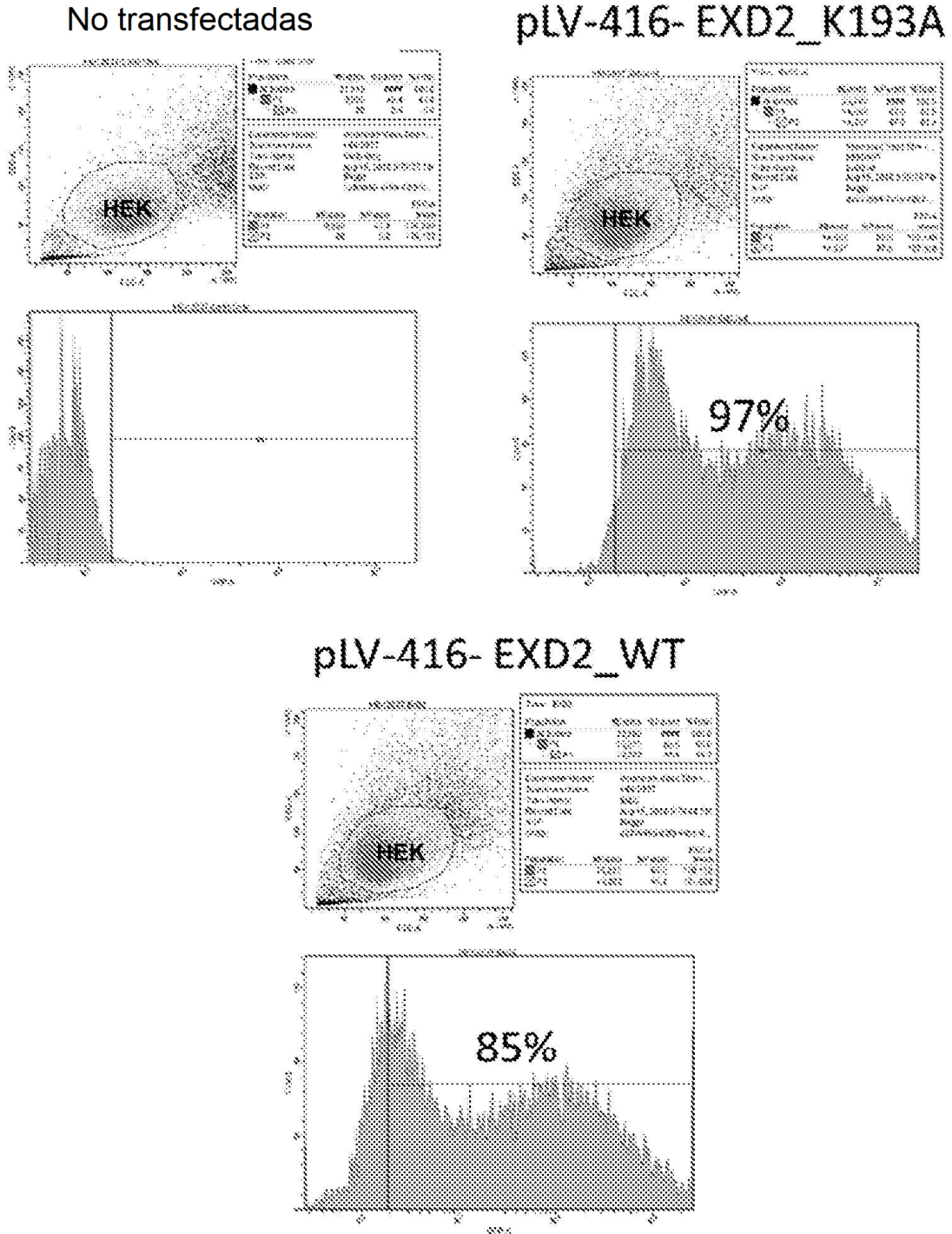


FIGURA 22

